

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUDMILLA DELLA COLETTA TROIANO

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS
ANTI-gp51 DO VÍRUS LEUCOSE BOVINA (VLB)**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre no curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Área de Concentração: Saúde Animal e Humana, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Vanete Thomaz Soccol

CURITIBA

2009

LUDMILLA DELLA COLETTA TROIANO

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS
ANTI-gp51 DO VÍRUS LEUCOSE BOVINA (VLB)**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre no curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Área de Concentração: Saúde Animal e Humana, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Vanete Thomaz Soccol

CURITIBA
2009

A todos os que buscam sentido para a vida, com uma perspectiva mais ampla do que os poucos anos que temos para nascer, crescer e trabalhar antes de deixar este mundo.

A todos os que acreditam que o espírito é eterno, e que nossa vida neste mundo não se resume senão a um estágio de aprendizado rumo à perfeição.

A todos os que se esforçam para melhorar um pouco a cada dia, mesmo que muitas vezes falhando sob o peso das próprias imperfeições.

Àqueles que, mesmo sem conseguir fazer muita coisa, acenderam no seu íntimo a certeza de que a vida, como um todo, faz sentido, e que todos nós fazemos parte dela.

CARLOS RIBEIRO

AGRADECIMENTOS

À Deus e a todos os Espíritos de luz, pela benção da vida, sabedoria nos momentos difíceis, luz quando o caminho parecia escuro, pelas respostas quando elas pareciam impossíveis e pela proteção.

Aos meus pais Celso Gonçalves Troiano e Ivete de Fátima Dela Coletta Troiano pelo amor incondicional, pela paciência, e apoio. Por terem feito o possível e o impossível para me oferecerem as melhores oportunidades, acreditando e respeitando minhas decisões e nunca deixando que as dificuldades acabassem com os meus sonhos, serei eternamente grata.

Ao meu amor, Otávio Cesar Araujo por estar do meu lado em todos os momentos, pela paciência na formatação e nas viagens, apoio, carinho e por sempre dizer que tudo iria dar certo.

Ao meu irmão Lucas Troiano e minha irmã de coração Michelly Amo pelo apoio e descontração quando tudo parecia tão difícil.

Ao meu padrinho e amigo muito especial Dr. Luis Fernando de Oliveira Ribas que acreditou que um dia eu chegaria até aqui, obrigada pela confiança, apoio, este é mais um sonho concretizado com sua ajuda.

À Professora Vanete Thomaz Soccol pela orientação, construção, paciência, oportunidade, pelos ensinamentos não só científicos como de vida e por principalmente acreditar em mim.

Aos amigos preciosos Dr. Claudio Xavier e Maria Cristina Staut pela força e por me ensinarem com suas histórias de vida e luta muitos valores.

À Josiane Brodzinski e Heloiza Wasilewski por terem sentido junto comigo, todas as angústias e felicidades, acompanhando cada passo de perto. Pelo amor, amizade, e apoio depositados, além da companhia.

À um amigo especial, Flávio Hiroshi Itano, por tudo que me ensinou, pela convivência, amizade, carinho e um pouquinho de si que deixou.

Ao gerente Jorge Victor Bacila Agottani, pelo coração maravilhoso, amizade, confiança, apoio e compreensão.

À Tânia Regina Penha, pelo primeiro passo e apoio dado para o início deste trabalho.

À todos os funcionários do Instituto de Tecnologia do Paraná pela ajuda e credibilidade, em especial; Marcos e Valmir na preparação dos materiais, Rafael e Simone no preparo de soluções e meios, Leodir pelo cuidado do biotério, Lucianna e Gisele pela força e ajuda nos cultivos, Robson pelas idéias e serviços, André pelas impressões e amigos Erica, Maria Helena, Lucivanda, Jandira e Reginaldo.

Ao setor Controle de Qualidade pela disponibilização do espaço e paciência com o cheiro do éter.

Ao Instituto de Tecnologia do Paraná e ao diretor Renato Rau, por autorizar e apoiar a realização do projeto de pesquisa dentro do mesmo.

À Universidade Federal do Paraná, em especial ao curso de pós-graduação em processos biotecnológicos.

Às amigas valiosas que fiz no período do mestrado Silvia, Ellen, Juliana, Kátia, Daniel Ernesto, pelo apoio, as horas de conversa e aos grandes e sábios conselhos.

Ao professor José A. Rodríguez León por ensinar com todo carinho o mundo das fermentações e da tão difícil matemática tornando-as um pouco mais compreensíveis.

Aos colegas Giovanny Mazzaroto e Juliano Bordighon do Instituto de Biologia Molecular do Paraná, pela orientação e disponibilidade de materiais.

Aos animais, pois sem eles não seria possível realizar este trabalho.

Agradeço a todas as pessoas do meu convívio e familiares que acreditaram e contribuíram, mesmo que indiretamente, para a conclusão deste trabalho.

À todos muito obrigada!

“Prossegue e não temas os espinhos ou pedras do caminho da vida”
(Santo Antônio)

“Navegue, descubra tesouros, mas não os tire do fundo do mar, o lugar deles é lá.

Admire a lua, sonhe com ela, mas não queira trazê-la para a terra.

Curta o sol, se deixe acariciar por ele, mas lembre-se que o seu calor é para todos.

Sonhe com as estrelas, apenas sonhe, elas só podem brilhar no céu.

Não tente deter o vento, ele precisa correr por toda parte, ele tem pressa de chegar
sabe-se lá onde.

Não apare a chuva, ela quer cair e molhar muitos rostos, não pode molhar só o seu.

As lágrimas? Não as seque, elas precisam correr na minha, na sua, em todas as
faces.

O sorriso! Esse você deve segurar, não deixe-o ir embora, agarre-o!

Quem você ama? Guarde dentro de um porta jóias, tranque, perca a chave!

Quem você ama é a maior jóia que você possui, a mais valiosa.

Não importa se a estação do ano muda, se o século vira e se o milênio é outro, se a
idade aumenta; conserve a vontade de viver, não se chega à parte alguma sem ela.

Abra todas as janelas que encontrar e as portas também.

Persiga um sonho, mas não deixe ele viver sozinho

Alimente sua alma com amor, cure suas feridas com carinho.

Descubra-se todos os dias, deixe-se levar pelas vontades, mas não enlouqueça por
elas.

Sempre procure o fim de uma história, seja ela qual for.

Dê um sorriso para quem esqueceu como se faz isso.

Acelere seus pensamentos, mas não permita que eles te consumam.

Olhe para o lado, alguém precisa de você.

Abasteça seu coração de fé, não a perca nunca.

Mergulhe de cabeça nos seus desejos e satisfaça-os.

Agonize de dor por um amigo, só saia dessa agonia se conseguir tirá-lo também.

Procure os seus caminhos, mas não magoe ninguém nessa procura.

Arrependa-se, volte atrás, peça perdão! Não se acostume com o que não o faz feliz,
revolte-se quando julgar necessário.

Alague seu coração de esperanças, mas não deixe que ele se afogue nelas.

Se achar que precisa voltar, volte! Se perceber que precisa seguir, siga!

Se estiver tudo errado, comece novamente.e estiver tudo certo, continue.

Se sentir saudades, mate-a.

Se perder um amor, não se perca! Se achá-lo, segure-o!

Circunda-te de rosas, ama, bebe e cala.

O mais é nada".

(FERNANDO PESSOA)

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURA.....	12
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	16
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 HISTÓRICO.....	20
2.2 LEUCOSE BOVINA.....	20
2.3 O AGENTE ETIOLÓGICO DA LEB	21
2.4 TRANSMISSÃO	25
2.5 PATOGENIA	27
2.6 DIAGNÓSTICO	28
2.7 DOENÇA CLÍNICA.....	30
2.8 PREVALÊNCIA	30
2.8 ASPECTOS ECONÔMICOS E SANITÁRIOS	37
2.9 CONTROLE E PREVENÇÃO	39
2.10 ANTICORPOS.....	41
2.10.1 Imunoglobulinas	41
2.10.2 Anticorpos Monoclonais	43
3 MATERIAL E MÉTODOS	50
3.1 PRODUÇÃO DO ANTÍGENO	50
3.1.1 Cultivo de células FLK infectadas com VLB	50
3.1.2 Concentração do sobrenadante FLK-BLV	53
3.1.3 Purificação do sobrenadante FLK-BLV concentrado.....	53
3.1.4 Determinação protéica do VLB	53
3.1.5 Lise do vírus VLB	54
3.2 IMUNIZAÇÃO DOS ANIMAIS.	54
3.2.1 Seleção e manejo dos animais	54
3.2.2 Inoculação intraperitoneal	54
3.2.3 Avaliação da imunidade humoral dos camundongos para o vírus VLB-Lis por imunodifusão	55
3.3 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS.....	55
3.3.1 Cultivo de mieloma	56
3.3.2 Coleta de macrófagos intraperitoneal	56
3.3.3 Coleta de linfócitos do baço dos animais imunizados	56

3.3.4 Fusão.....	57
3.4 TRIAGEM DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS POR ELISA.....	58
3.4.1 Titulação VLB Lis x Conjugado anti- IgG camundongo	58
3.4.1.1 Adsorção do Antígeno.....	58
3.4.1.2 Lavagem.....	58
3.4.1.3 Bloqueio dos sítios de ligação inespecíficos.....	58
3.4.1.4 Incubação do Soro Positivo	59
3.4.1.5 Incubação do Conjugado	59
3.4.1.6 Solução reveladora	59
3.4.1.7 Parada da Reação	59
3.4.1.8 Leitura.....	59
3.4.2 ELISA para seleção dos hibridomas positivos contra VLB	60
3.5 TESTE DE ESTABILIDADE DOS HIBRIDOMAS	60
3.6 CARACTERIZAÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS	60
3.6.1.1 Perfil eletroforético do VLB-Lis.....	60
3.6.1.2 Preparo do Gel SDS-PAGE	60
3.6.1.3 Preparo e aplicação do VLB- Lis e do marcador de peso molecular.....	61
3.6.1.4 Corrida eletroforética	61
3.6.1.5 Revelação do gel.....	61
3.6.2 Imunoeletrotransferência (<i>Western Blotting</i>).....	62
3.6.2.1 Montagem da Cuba para a Transferência (WB)	62
3.6.2.2 Transferência (WB)	62
3.6.2.3 Preparo da Membrana	62
3.6.2.4 Lavagem.....	63
3.6.2.5 Bloqueio.....	63
3.6.2.6 Incubação do sobrenadante dos hibridomas	63
3.6.2.7 Incubação do Conjugado	63
3.6.2.8 Solução reveladora	63
3.6.3 Isotipagem.....	64
3.6.3.1 Diluição do anticorpo.....	64
3.6.3.2 Diluição dos isotipos.....	64
3.6.3.3 Diluição do conjugado.....	64
3.6.3.4 Solução reveladora	64
3.7 PRODUÇÃO DE LÍQUIDO ASCÍTICO E HIBRIDOMA ASCÍTICO.....	65
4 RESULTADOS.....	66
5 DISCUSSÃO	73
6 CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS.....	80
ANEXO.....	95

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	- REPRESENTAÇÃO DE UM RETROVÍRUS, SUPERFÍCIE (SU); TRANSMEMBRANA (TM); TRANSCRIPTASE REVERSA (RT); INTEGRASE (IN); NUCLEOCAPSÍDEO (NC); CAPSÍDEO (CA); PROTEASE (PR); MATRIZ (MA); BICAMADA LIPÍDICA.....	22
FIGURA 2	- REPRESENTAÇÃO DO GENOMA DO GRUPO HTLV-BLV.....	24
FIGURA 3	- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS GENES GAG E ENV, PRECURSORES DAS PROTEÍNAS DO VLB E OS POSSÍVEIS SÍTIOS DE LIGAÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS.....	25
FIGURA 4	- DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE UMA MOLÉCULA DE IMUNOGLOBULINA (IG).....	42
FIGURA 5	- ONTOGÊNESE DO LINFÓCITO B.....	43
FIGURA 6	- REPRESENTAÇÃO DA VIA DE SINTESE DE NUCLEOTÍDEOS E DROGA DE SELEÇÃO PARA HIBRIDOMAS VIÁVEIS.....	45
FIGURA 7	- PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS PELA TECNOLOGIA DE HIBRIDOMA.....	46
FIGURA 8	- ÁRVORE DA FAMÍLIA DE MIELOMA.....	48
FIGURA 9	- TESTE DE IMUNODIFUSÃO EM ÁGAR PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-VLB. 1) SORO HIPERIMUNE 5º IMUNIZAÇÃO; 2) VÍRUS VLB - LISADO; 3) SORO HIPERIMUNE 2º IMUNIZAÇÃO.....	66
FIGURA 10	- CÉLULAS DE MACRÓFAGOS PERITONIAIS DE CAMUNDONDO, PRÉ-FUSÃO, ADERIDAS NO POÇO DA PLACA DE CULTIVO.....	67
FIGURA 11	- FORMAÇÃO DA COLÔNIA DE HIBRIDOMA APÓS DEZ DIAS DE FUSÃO.....	67
FIGURA 12	- GEL SDS-PAGE A 12,5%. 1) VLB-LISADO; 2) MARCADOR DE PESO MOLECULAR (BENCHMARK 220-10kDa).....	68
FIGURA 13	- CONFIRMAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-gp51 PELA TÉCNICA DE <i>WESTERN BLOTTING</i> . 1) CLONE B3; 2) CLONE C2; 3) CLONE D4; 4) CLONE E3; 5) CLONE E4; 6) CLONE E10; 7) CLONE F1; 8) CLONE F5; 9) CLONE F11; 10) CLONE G8; 11) MARCADOR DE PESO MOLECULAR (BENCHMARK 220-10kDa).....	69
FIGURA 14	- ISOTIPAGEM DOS MONOCLONAIS PRODUZIDOS CONTRA O VÍRUS VLB-LISADO. 1) CLONE B3; 2) CLONE C2; 3) CLONE D4; 4) CLONE E3; 5) CLONE E4; 6) CLONE E10; 7) CLONE F1; 8) CLONE F5; 9) CLONE F11; 10) CLONE G8.....	70
FIGURA 15	- AcMc ASCÍTICO CONTRA A PROTEÍNA gp51 DO VLB.....	71
GRÁFICO 1	- REPRESENTAÇÃO DA ABSORBÂNCIA ENTRE HIBRIDOMAS E HIBRIDOMAS ASCÍTICO.....	72
GRÁFICO 2	- REPRESENTAÇÃO DA DETERMINAÇÃO PROTÉICA ENTRE HIBRIDOMAS E HIBRIDOMAS ASCÍTICO.....	72

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- CLASSIFICAÇÃO DOS RETROVÍRUS POR GÊNEROS.....	21
TABELA 2	- OCORRÊNCIA DE LEUCOSE ENZOÓTICA EM BOVINOS NAS REGIÕES SUL, SUDESTE, CENTRO-OESTE, NORDESTE E NORTE DO BRASIL, SEGUNDO AUTOR, ANO, LOCAL, TÉCNICA, RAÇA OU APTIDÃO ZOOTÉCNICA DOS ANIMAIS.....	35
TABELA 3	- PRINCIPAIS LINHAGENS DE MIELOMAS UTILIZADAS EM PROCESSOS DE FUSÃO.....	49
TABELA 4	- ESPECIFICIDADE; CLASSES E SUBCLASSES DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS PRODUZIDOS CONTRA O VLB-LISADO.....	70
QUADRO 1	- FLUXOGRAMA DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS.....	51

LISTA DE ABREVIATURA

AcMc	- Anticorpos monoclonais
CO ₂	- Dióxido de carbono
DNA	- Ácido Desoxirribonucléico
ELISA	- Ensaio Imunoenzimático
FLK-BLV	- Fetal Lamb Kidney-Bovine Leukosis Virus (células de rim de feto de ovelha cronicamente infectadas pelo vírus da leucose bovina)
G	- Grama
GL	Gay Lusac
HAT	- Hipoxantina Aminopterina Timidina
HeLa	- Célula humana de câncer cervical - Henrietta Lacks
HGPRT	- Hipoxantina-Guanina-Fosforribonosil-Transferase
HPRT	- Hipoxantina Fosforibosil Transferase
IDGA	- Imunodifusão em gel de ágar
IL1	- Interleucina – 1
IL6	- Interleucina – 6
IL8	- Interleucina – 8
Fab	- Fragmento de ligação ao antígeno
Fc	- Fragmento cristalizável
Ig	- Imunoglobulina
IgA	- Imunoglobulina A
IgD	- Imunoglobulina D
IgE	- Imunoglobulina E
IgG	- Imunoglobulina G
IgM	- Imunoglobulina M
kDa	- Kilodalton
Kg	- Kilograma
L/min	- Litros por minuto

LB	- Leucose bovina
LEB	- Leucose enzoótica bovina
LP	- Linfocitose persistente
mA	- Milliampere
mg	- Miligrama (s)
mg/mL	- Miligrama (s) por mililitro
mL	- Mililitro (s)
mM	- Milimol
MOPC21	- Mineral Oil Plasmacitoma Cell – Plasmocitoma induzido por óleo mineral
nm	- Nanômetro
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
PEG	- Polietilenoglicol
PEG/DMSO	- Polietilenoglicol/dimetilsulfóxido
PVDF	- Polivinil difloro
R _C	- Regiões Constantes
R _V	- Regiões Variáveis
C _L	- Região constante da cadeia leve da imunoglobulina
C _H	- Região constante da cadeia pesada da imunoglobulina
V _L	- Região variável da cadeia leve da imunoglobulina
V _H	- Região variável da cadeia leve da imunoglobulina
RNA	- Ácido riboxinucléico
RNA _m	- Ácido riboxinucléico menssageiro
RPMI	- Roswell Park Memorial Institute
SFB	- Soro Fetal Bovino
SPF	- Livre de agentes patogênicos (Specific Patogen Free)
U.V	- Ultra Violeta
VLB	- Vírus da leucose bovina
VLB-Lis	- Vírus da leucose bovina lisado
WB	- <i>Western Blotting</i>
µg	- Micrograma (s)

LISTA DE SIGLAS

TECPAR - Instituto de Tecnologia do Paraná

FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz

UFPR - Universidade Federal do Paraná

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi produzir e caracterizar anticorpos monoclonais (AcMc) contra proteína gp51 para insumo de diagnóstico da Leucose Enzoótica Bovina. Foram utilizadas duas preparações do antígeno para imunização em camundongos BALB/c, a partícula viral *in natura* e o vírus lisado. Estas preparações foram selecionadas para obtenção de anticorpos monoclonais específicos para proteínas da partícula viral e proteínas virais intracelulares do VLB, respectivamente. Os animais foram imunizados por via intraperitoneal devido a toxicidade causada pelo tampão de lise em outras vias de inoculação. A fusão realizada originou 274 colônias de hibridomas, sendo 18 hibridomas positivos em ELISA indireto e nove fraco positivo, inicialmente descartados. O teste de estabilidade de secreção de anticorpos permitiu selecionar 10 hibridomas, que foram caracterizados pela reatividade em *Western Blotting*, para proteína gp51 (dez AcMc), e por isotipagem em IgG1 (um AcMc); IgM (nove AcMc). Todos os AcMc foram produzidos para gp51 comprovando ser a proteína do VLB mais imunogênica e acessível, presente em diferentes preparações antigênicas. A produção de AcMc ascítico mostrou aumento qualitativo e quantitativo de secreção de anticorpos, quando comparado aos AcMc que não foram submetidos ao líquido ascítico.

Palavra Chave: Leucose Bovina. Anticorpos monoclonais.

ABSTRACT

The objective of this work was to produce and characterize monoclonal antibodies (mAbs) against the protein gp51 for a diagnosis input of the Bovine Enzootic Leukosis. Two different preparations of the antigen for immunizing BALB/c mice were used, *in natura* viral particle and lysate virus. These preparations were selected to obtain specific monoclonal antibodies for the viral particle protein and BLV intracellular viral proteins, respectively. The animals were immunized through intraperitoneal way due to the toxicity caused by the lysis buffer in other ways of inoculation. The fusion originated 274 hybridoma colonies, from which 18 hybridomas were positive on indirect ELISA and nine were weak positive, initially discarded. The stability test of antibodies secretion, 10 hybridomas were selected, characterized by the *Western Blotting* reactivity, for the protein gp51 (ten mAbs) and by isotyping IgG1 (one mAb); IgM (nine mAbs). All mAbs were produced for gp51 proving to be the BLV most immunogenic and accessible protein present in different antigenic preparations. The production of ascitis mAbs has shown a qualitative and quantitative improvement of the mAbs secretion when compared with the (mAbs) were not subject to ascites fluid.

Key-words: Bovine Leukosis. Antibodies Monoclonal.

1 INTRODUÇÃO

A leucose enzoótica bovina (LEB) é uma enfermidade neoplásica de caráter crônico, causada por um retrovírus que possui um longo período de incubação (dois a cinco anos); sua origem ocorre no tecido linfóide e é freqüentemente diagnosticada nos animais domésticos (JONES *et al.*, 2000). Em bovinos é conhecida também como: linfossarcoma, linfoma maligno, linfomatose e leucemia bovina. É o neoplasma mais presente em bovinos de leite, mas acomete ocasionalmente o gado de corte (BARROS, 2007).

A LEB pode ocasionar linfocitose persistente (LP), linfossarcoma ou pode apresentar-se de forma inaparente, ou seja, sem quadro clínico, porém o animal é portador e disseminador do vírus. É uma doença negligenciada devido a pequena quantidade de animais clinicamente afetados.

A LEB pode promover uma desordem no sistema imunológico dos bovinos aumentando sua suscetibilidade a outras doenças infecciosas (FERRER, 1980) e ocasionando, indiretamente, redução na eficiência produtiva e reprodutiva, principalmente em rebanhos de leite. Devido à imunossupressão, e conseqüente ocorrência de infecções secundárias, os animais infectados podem ser descartados precocemente, antes mesmo do aparecimento de qualquer sinal clínico relacionado com a LEB.

GARCIA *et al.* (1995), relataram uma maior predisposição de animais infectados, pelo vírus da leucose bovina (VLB), à mastite bovina. Clinicamente este é o problema mais freqüente e que acarreta maior gasto com medicamentos em propriedades leiteiras.

A importância econômica da infecção pelo VLB é decorrente de vários fatores como, perdas na exportação para mercados que requerem animais livres da infecção, custos com o diagnóstico e tratamento das infecções secundárias decorrentes da desordem do sistema imunológico.

Por esta razão, muitos países, especialmente na Europa que implementaram programas de controle e erradicação da LEB, utilizando testes laboratoriais para

detecção de animais positivos, se destacaram no controle e prevenção desta enfermidade (JOHNSON & KANEENE, 1992).

A LEB é comumente diagnosticada pela presença de anticorpos em amostras de soro ou leite. Os anticorpos são detectados no soro de animais dentro de 2 a 8 semanas pós-infecção. Anticorpos transferidos pela mãe podem demorar até sete meses para desaparecer.

O método atualmente utilizado para detecção de animais infectados no Brasil é a imunodifusão em gel de ágar (IDGA), é um teste específico, mas não muito sensível, sendo utilizado para amostras individuais de soro ou plasma sanguíneo. Esta metodologia não permite a pesquisa de anticorpos em amostras de leite, devido a perda de especificidade e sensibilidade (OIE, 2004).

O ensaio imunoenzimático (ELISA) é um dos mais sensíveis teste sorológico, pode ser utilizado em amostras individuais e agrupadas de leite, além de ser um teste rápido pode ser realizado em inúmeras amostras ao mesmo tempo. O ELISA supera a técnica de IDGA em sensibilidade, pois este último permite identificar a presença da infecção do VLB em apenas 50% do rebanho, quando comparado ao primeiro (RADOSTITS *et al.*, 2002).

O teste ELISA é baseado na utilização de proteínas virais, parcialmente purificadas e específicas. A utilização de reagentes de tal técnica tem um importante impacto no processo de desenvolvimento do diagnóstico. A exemplo podemos citar os anticorpos monoclonais (AcMc) para as proteínas gp51 e p24, que vêm sendo empregado na área da saúde animal (BAN *et al.*, 1990)

Devido ao tamanho do rebanho brasileiro e a ausência de insumos para o diagnóstico no mercado interno, a realização de testes laboratoriais para identificação dos animais infectados torna-se economicamente inviável e é evidenciado como um ponto de estrangulamento no diagnóstico. Estes são os principais fatores que inibem as iniciativas de implementação de programas de controle da doença.

O Brasil ainda não possui disponível um kit ELISA comercial utilizando monoclonais para a detecção da LEB, os kits atualmente são importados e o tempo dos tramites de importação é longo tornando o produto muito caro.

Torna-se evidente que existe a necessidade no mercado nacional da disponibilidade de insumos para o diagnóstico da LEB a um custo acessível e que permitam exames de alta especificidade.

Buscando contribuir para solucionar esta problemática o objetivo do presente trabalho foi a produção e caracterização de AcMc anti gp51 do VLB; seguido dos objetivos específicos:

Aperfeiçoar a metodologia de produção do antígeno VLB para a obtenção dos AcMc;

Analisar a melhor condição antigênica (conformação e purificação do antígeno) para obtenção dos AcMc específicos para proteínas do VLB;

Utilizar os AcMc produzidos na produção de um kit ELISA nacional para detecção da LEB. Tornando o diagnóstico mais sensível, prático e viável para controle e erradicação desta infecção.

Utilizar os AcMc como uma ferramenta para purificar a gp51 do vírus VLB, e este ser utilizado como antígeno para diagnóstico

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

A leucose bovina (LB) foi descrita pela primeira vez por LEISERING na Alemanha em 1871. Considera-se que a Europa seja o berço da infecção e acredita-se que a doença tenha origem na região Memel, situada na Prússia Oriental, movendo-se para oeste com o passar dos anos (SCHOTTLER & SCHOTTLER, 1934, JOHNSON & KANEENE, 1992). Segundo FELDMAN (1928) e SORENSEN (1961), o gado europeu infectado com VLB foi importado da costa do mar Báltico para os Estados Unidos no final do século XIX, embora existam relatos do aparecimento antes deste período. Após a segunda guerra mundial as migrações e as movimentações de bovinos embasaram a hipótese de migração da LB para regiões orientais e ocidentais (BIRGEL, 1982). A infecção difundiu-se no gado americano e canadense contribuindo para a disseminação do VLB em outros países da Europa e América do Sul (JOHNSON & KANEENE, 1992).

O primeiro relato da doença no Brasil foi realizado por RANGEL & MACHADO em 1943. Neste trabalho foram identificados neoplasias em animais domésticos no estado de Minas Gerais com quatro casos de linfossarcoma em bovinos.

2.2 LEUCOSE BOVINA

A LB é classificada de acordo com aspectos etiológicos e epidemiológicos em: Enzoótica ou Esporádica (OHSIMA *et al.*, 1980; DIVERS *et al.*, 1995). RADOSTITS *et al.* (2002) afirmaram que a forma esporádica é causada por um agente etiológico desconhecido, acomete animais jovens com idade inferior a três anos e apresenta-se sob três formas clínicas:

1 – Juvenil: em bezerros com menos de seis meses de idade, caracterizada por enfartamento múltiplo do linfonodo;

2 – Tímica: nos animais com menos de dois anos de idade, caracterizada por dilatação no pescoço causando timpanismo e edema;

3 – Cutânea: em bovinos de um a três anos de idade, caracterizada pelo desenvolvimento de nódulos e placas na pele.

A LEB é causada por um vírus da família Retroviridae, denominado VLB. É uma doença que afeta clinicamente o gado adulto, entre cinco a sete anos, caracterizada por uma neoplasia no tecido linfoide. As infecções geralmente são sub-clínicas e latentes, podendo ou não apresentar linfossarcoma e LP. A maioria dos casos evidenciado na literatura refere-se à forma Enzoótica. A Esporádica é rara e dificilmente ocorre, sua estimativa é de 0,5 a 1,2 bovinos em 100.000 (OLIVER *et al.*, 1994).

2.3 O AGENTE ETIOLÓGICO DA LEB

Os retrovírus são divididos em três subfamílias: Oncovirinae, Lentivirinae e Spumavirinae e sete gêneros, baseado essencialmente na patogenicidade, relação de seqüências de nucleotídeos e estrutura genômica (TABELA 1)(WEISS, 2006).

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO DOS RETROVÍRUS POR GÊNEROS

GÊNERO	GENOMA	VÍRUS
<i>Alpharetrovirus</i>	Simples	Vírus da leucemia aviária (ALV)
<i>Betaretrovirus</i>	Simples	Vírus do tumor mamário dos ratos (MMTV)
<i>Gammaretrovirus</i>	Simples	Vírus da leucemia de camundongos (MLV) e vírus da leucemia felina (FeLV)
<i>Epsilonretrovirus</i>	Simples	Vírus da leucemia de peixe (WDSV)
<i>Deltaretrovirus</i>	Complexo	Vírus da leucemia bovina (HTLV-BLV) e os vírus HTLV humano
<i>Lentivirus</i>	Complexo	Vírus da imunodeficiência humana (HIV), imunodeficiência de felinos (FIV), símios (SIVmac) e anemia infecciosa eqüina (AIE)
<i>Spumavirus</i>	Complexo	Vírus espumoso de símios (SFV)

A LEB é causada por um vírus tipo C exógeno pertencente à família Retroviridae, subfamília Oncovirinae, gênero *Deltaretrovirus* e é um RNA vírus

tumoral. O seu material genético é diplóide, ou seja, possui duas fitas de RNA simples de polaridade positiva (FENNER *et al.*, 1993; MURPHY *et al.*, 1999).

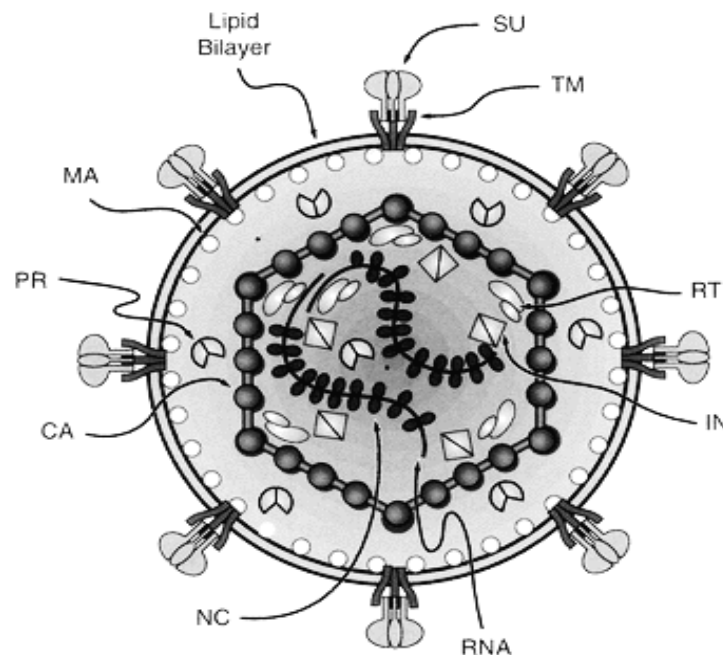


FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO DE UM RETROVÍRUS, SUPERFÍCIE (SU); TRANSMEMBRANA (TM); TRANSCRIPTASE REVERSA (RT); INTEGRASE (IN); NUCLEOCAPSÍDEO (NC); CAPSÍDEO (CA); PROTEASE (PR); MATRIZ (MA); BICAMADA LIPÍDICA.
FONTE: COFFIN *et al.* (1997).

O vírion dos retrovírus é esférico e envelopado, com cerca de 80-100 nm de diâmetro, possui uma estrutura de três camadas, a mais interna é o complexo genoma-nucleoproteína, que inclui aproximadamente trinta moléculas de transcriptase reversa. Esta estrutura é englobada por um capsídeo icosaédrico com aproximadamente 60 nm de diâmetro, que por sua vez é envolto por um envelope celular, onde se observam peplômeros de glicoproteínas (FIGURA 1) (MURPHY *et al.*, 1999). Sua composição química é de 60% de proteínas, 35% de lipídeos, 2,2% de ácido nucléicos e 0,5% de carboidratos (ABRAMOVA *et al.*, 1974; MUSSGAY *et al.*, 1978).

O vírus desta família faz sua replicação dentro do núcleo da célula hospedeira e possui uma baixa taxa de transcrição. O VLB pode levar um período de 10 horas para completar todo o processo de formação de um novo vírion (MURPHY *et al.*, 1999).

Todos os vírus da família Retroviridae possuem três genes, *gag* (antígeno grupo específico), *env* (envelope), *pol* (polimerase), comuns em seu material genético é responsáveis pela formação das proteínas virais.

O VLB e outros membros do seu grupo são ladeados por duas regiões idênticas denominadas LTR (Long Terminal Repeat) e contêm proteínas de fase aberta de leitura, sobrepostas denominadas ORF (Open Reading Frame), correspondendo aos genes *gag*, *pro* (protease), *pol* e *env*. As ORFs codificam proteínas virais regulatórias conhecidas como Tax, Rex, R3 e G4 presentes na região entre *env* e 3' LTR (região X). A transcrição do RNA genômico inicia e termina em 5' e 3' LTRs respectivamente. Este serve como modelo de expressão dos precursores do *gag-pol-pro* (pr145, pr66 e pr44) que são transformados e processados em estruturas e proteínas enzimáticas (FIGURA 2) (GILLET *et al.*, 2007).

Os genes *Tax* e *Rex* codificam proteínas reguladoras do genoma viral e são importantes no processo de infecção do vírus. O *Tax* é um regulador indireto da transcrição do genoma proviral, quando interage com diferentes proteínas regulatórias celulares. Este desenvolve importante papel na ativação de genes celulares, atua na transcrição de receptores de citocinas (IL-2) e promove aumento da velocidade de transcrição viral pela ativação do LTR. O gene *Rex* atua como um regulador pós-transcricional do genoma regulando o processo de “splicing” do RNAm viral (Weiss, 2006).

Os genes e suas respectivas proteínas estão divididos da seguinte forma:

Gag codifica duas poliproteínas de 66 e 44 kDa, respectivamente, estas são responsável pela formação das proteínas internas e estruturais do vírus (KETTMANN *et al.*, 1994). A Pr66^{gag-pro} é precursora da proteína matriz p15 (MA), proteína capsídeo p24 (CA), nucleocapsídeo p12 (NC) e protease p14 (PR). A Pr44^{gag} é similar a Pr66^{gag-pro}, mas não possui aminoácidos correspondentes a protease (WALKER *et al.*, 1987);

Pol origina a enzima transcriptase reversa (RT) e integrase p80 (IN);

Env codifica um precursor chamado Pr72 que sofre glicosilação e lise, originando as glicoproteínas do envelope (SU) e proteínas de transmembrana (TM) (FIGURA 3). Elas permanecem juntas por ligações não-covalentes e por pontes de

disulfeto sendo nomeadas gp51 (SU) e gp30 (TM), a gp51 possui oito potenciais sítios de glicosilação e oito resíduos de cisteína. Um total de 12 epítomos foram identificados na gp51. Destes, os chamados F (aminoácidos 64-73), G (aminoácidos 38-57) e H (aminoácidos 98-117) são os mais acessíveis, tendo associação com a infectividade e neutralização viral (BRUCK *et al.*, 1982a; 1982b);

Pro um gene menor também presente, codifica a enzima proteases p14 (PR);

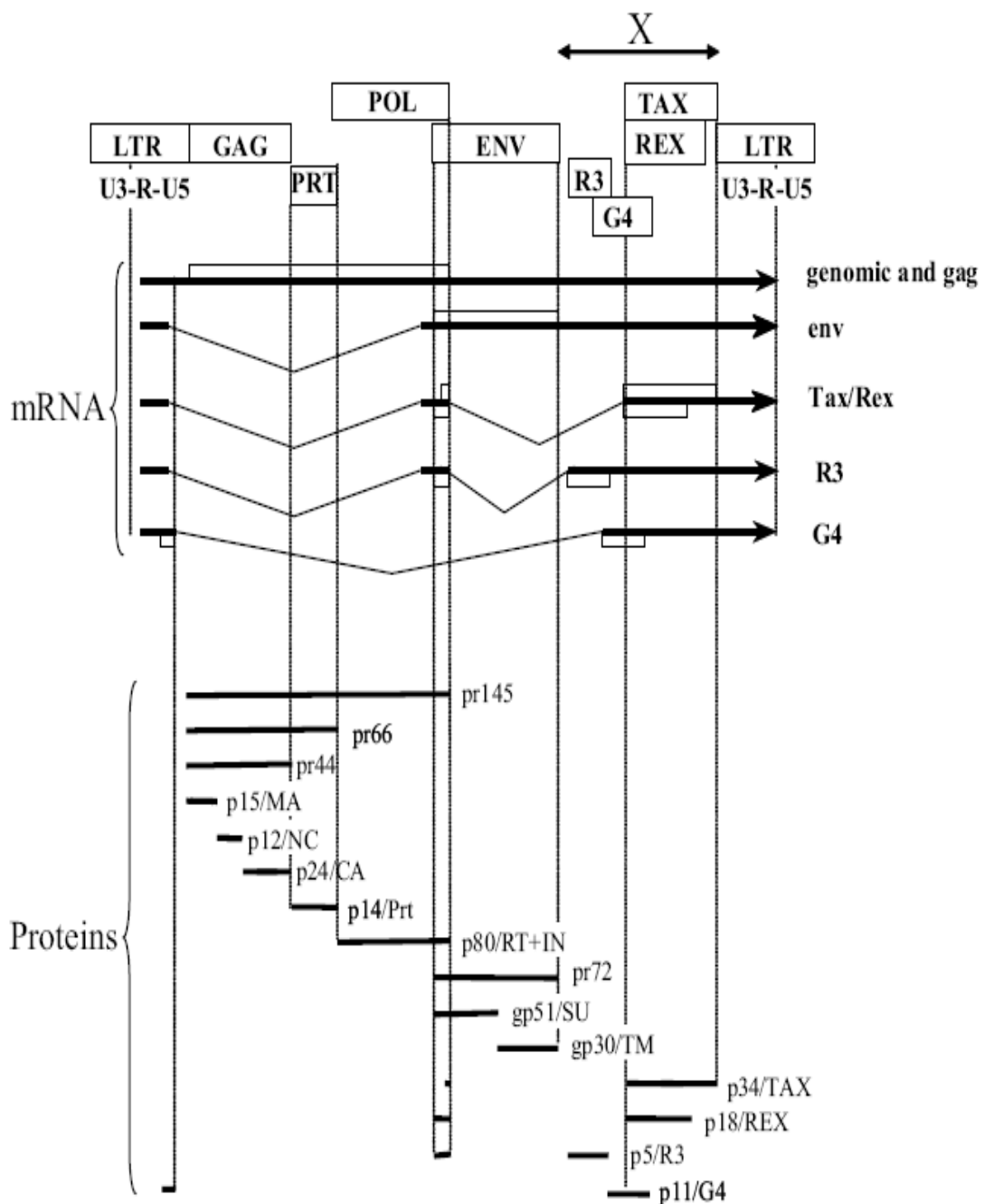


FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO DO GENOMA DE VÍRUS DO GRUPO HTLV-BLV
 FONTE: GILLET *et al.* (2007)

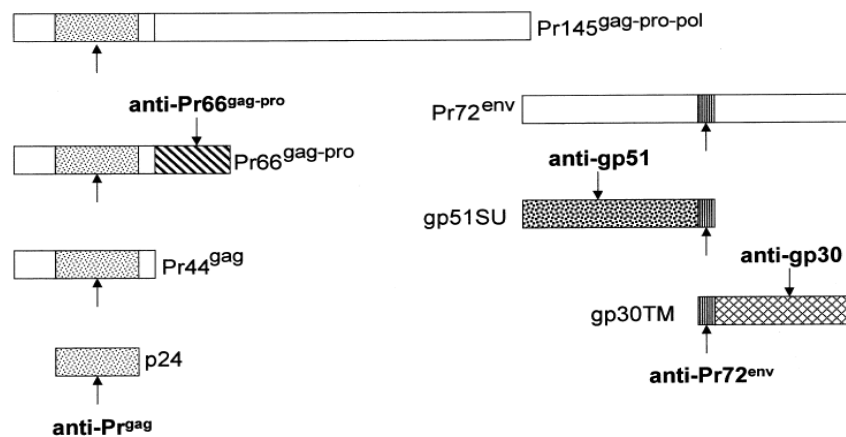


FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS GENES GAG E ENV, PRECURSORES DAS PROTEÍNAS DO VLB E OS POSSÍVEIS SÍTIOS DE LIGAÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS.

FONTE: LLAMES *et al.* (2000).

Uma quarta região é encontrada no VLB com capacidade transformante, denominada de gene *sarc* (sarcoma) ou *onc* (oncogenes celulares), implica em alterações celulares (FENNER *et al.*, 1993).

Estudos feitos por VAN DER MAATEN *et al.* (1974), nos Estados Unidos, possibilitaram a cultura de linhagens celulares que permitissem a replicação do VLB *in vitro*. O vírus foi produzido através de co-cultivo e por persistentes infecções com linfócitos, VLB positivos, em células fetais de rim de carneiro (Fetal Lamb Kidney – FLK) formando a linhagem FLK-BLV.

A FLK-BLV foi trazida ao Brasil no final dos anos 70 pelo Médico Veterinário Carlos Hipólito Romero Mercado (DITTRICH, 2004). Apesar de muitas tentativas terem sido realizadas para melhoramento das propriedades de produção do vírus e das linhagens preexistentes, para gerar novas linhagens correspondentes (GRAVES *et al.*, 1976; ALTANER *et al.*, 1985; ALTANEROVA *et al.*, 1989; MAMOUN *et al.*, 1990; WAGNER *et al.*, 1995), esta linhagem celular continua sendo utilizada para produção do antígeno VLB em kits de teste diagnóstico.

2.4 TRANSMISSÃO

O VLB infecta linfócito B e não tem sido encontrado livre da célula ou no sangue de animais infectados (STOCK *et al.*, 1972). A forma de transmissão do vírus está relacionada com a integridade do linfócito. Deste modo, duas formas de

transmissão foram evidenciadas, a vertical relacionada com a transmissão passiva e a forma horizontal relacionada a transmissão ativa (JOHNSON & KANEENE, 1992).

Segundo VAN DER MAATEN *et al.* (1982) e JOHNSON *et al.* (1985) a transmissão horizontal é a principal via de disseminação do vírus e pode ocorrer através de exposição direta a fluídos biológicos contaminados com linfócitos infectados, particularmente sangue, leite, sêmen e saliva. Entretanto, a LEB não é transmitida tão facilmente quanto outras doenças infecciosas comuns à espécie bovina.

A transmissão iatrogênica decorre da transferência de linfócitos infectados de um indivíduo para outro, seguida de uma resposta permanente ao anticorpo. A LEB pode se transmitir devido ao uso comum de instrumentos cirúrgicos como: agulhas contaminadas usadas em vacinações parenterais (EVERMANN *et al.*, 1987), uso de luvas contaminadas no exame retal (RADOSTITS *et al.*, 2002), colocação de brincos e descorna (DIGIACOMO *et al.*, 1985; LUCAS *et al.*, 1985), cirurgias (HOPKINS *et al.*, 1988) e aplicação de medicamentos (OIE, 2009). Quantidades de sangue tão pequenas quanto 0,1 μ L (4.524 linfócitos) de vacas soro positivas ao VLB, quando injetados em bezerros são capazes de transmitir a infecção (KLINTEVALL, 1995). Assim, o teste intradérmico para tuberculina também pode ser considerado uma via de disseminação do vírus (RADOSTITS *et al.*, 2002).

A inseminação artificial e a transferência de embriões intactos não são considerados métodos de transmissão da doença. Muitos pesquisadores cometeram equívocos ao afirmar a presença do vírus no sêmen (RADOSTITS *et al.*, 2002). O sêmen só pode ser considerado uma fonte de contaminação quando exposto a linfócitos infectados no processo de inseminação artificial. Essa contaminação ocorre quando a massagem da uretra do doador positivo e das glândulas acessórias retal é feita de maneira incorreta e grosseira (JOHNSON & KANEENE, 1992).

PERINO *et al.* (1990), relataram a transmissão do VLB por insetos hematófagos (tabanídeos, moscas picadoras e carrapatos infectados), os rebanhos numerosos com grande percentual de animais infectados junto a alta população de insetos eram mais atingidos com a infecção. A difusão também foi relacionada diretamente com a sazonalidade, sendo mais intensa no verão e em regiões

tropicais (MANET *et al.*, 1989). A possibilidade de transmissão do vírus parece ser maior com sangue de animais com linfocitose persistente (ITOHARA *et al.*, 1985).

A premunicação contra *Babesia* sp. e *Anaplasma* sp. (hemoparasitas) exerceu papel na disseminação do vírus, por inoculação de sangue fresco obtido de animais infectados pelo VLB em animais clinicamente sadios (ROMERO *et al.*, 1981).

A forma vertical, infecção intra-uterina ou congênita, ocorre em 1,2 a 6,4% dos animais nascidos de vacas infectadas pelo VLB, o que provavelmente resulta da exposição transplacentária ao vírus durante a gestação (VAN DER MAATEN *et al.*, 1981; THURMOND *et al.*, 1983; LASSAUZET *et al.*, 1991). O colostro e/ou leite também são fontes significativas de contaminação para terneiros recém nascidos (FERRER *et al.*, 1981; ROMERO *et al.*, 1983; MOLNÁR, *et al.*, 1998).

A transmissão do VLB no período pré-natal, freqüentemente ocorre após o primeiro trimestre de gestação. As vacas com alta concentração de vírus e baixo título de anticorpos podem transmitir a infecção ao feto. Entretanto, fêmeas com baixa concentração de vírus e um alto título de anticorpos, promovem a transferência de imunidade para os fetos, a qual permanece por alguns meses (JACOBSEN, 1983).

MILLER & VAN DER MAATEN (1979), afirmam que uma vez o vírus introduzido em um rebanho, os animais positivos passam a constituir-se em uma fonte contínua de disseminação do agente causador da doença e conseqüentemente infecção dos demais animais do rebanho.

2.5 PATOGENIA

O DNA proviral do VLB como os demais retrovírus, é dependente da enzima transcriptase reversa. No início da infecção a partícula viral necessita ligar-se à superfície celular, a inserção ocorre entre os receptores específicos da superfície celular e as glicoproteínas do envelope viral (gp51 e gp30), originárias da proteína Pr⁷². A glicoproteína externa, gp51, uni o vírus à célula alvo (linfócito B) e é responsável pela infectividade do vírus e pela etapa inicial da infecção. A glicoproteína, gp30, ancora o envelope do vírus na membrana plasmática da célula infectada (SUZUKI *et al.*, 1998). Durante a infecção inicial, o vírus libera todo seu conteúdo no citoplasma. Neste, apenas uma das duas fitas simples de RNA viral é

transcrita a DNA de fita dupla pela transcriptase reversa. A dupla fita de DNA linear migra para o núcleo e integra-se no genoma do hospedeiro pela ação de uma integrase viral. Uma vez integrado, o provírus utiliza a maquinaria celular para a transcrição primária do RNA genômico. Parte do RNA viral sintetizado é processada para gerar o RNAm que será traduzido nas proteínas virais apropriadas no citoplasma. Como último passo, o *core* viral é montado e o vírus é liberado da superfície celular por um processo parcialmente simultâneo (SEIKI *et al.*, 1984).

Após a entrada do vírus no organismo do hospedeiro, o VLB tem tropismo pelos linfócitos B (AIDA *et al.*, 1989) e geralmente poderá permanecer apenas em estágio latente, sendo o animal um transmissor do vírus sem apresentar, no entanto, LP e ou tumores (linfossarcomas), cujo o desenvolvimento é determinado pela constituição genética do hospedeiro (RADOSTITS *et al.*, 2002).

A LEB é uma doença de caráter crônico, os bovinos podem apresentar anticorpos a partir da segunda semana após a infecção. Essa virose freqüentemente ocorre de forma inaparente, ou seja, sem sinais clínicos. Entretanto o animal mesmo sem apresentar estes sinais é um importante portador e disseminador do vírus (EMANUELSSON *et al.*, 1992). A LP é o aumento, policlonal, persistente de linfócito B na circulação sangüínea, é também considerada como uma forma benigna da doença desenvolve-se em 30 a 70% dos animais infectados, enquanto a sua forma tumoral, linfossarcoma multicêntrico, em animais adultos é uma enfermidade altamente fatal e constitui-se na neoplasia mais comum dos bovinos, acomete 5% a 10% dos animais infectados (FERRER, 1979; BARROS 2007). Para FERRER (1979), a grande maioria dos animais infectados com VLB não desenvolve linfossarcoma, LP ou qualquer outro sinal clínico. Estes animais apresentam uma infecção persistente e podem ser identificados pela presença de anticorpos anti-VLB (COCKRELL *et al.*, 2000).

2.6 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da LEB é fundamental para controle e a posterior erradicação da doença. O diagnóstico laboratorial inclui a biópsia de linfonodos suspeitos, contagem de linfócitos B em exames de sangue (sendo de pouca utilidade), e testes sorológicos, que identificam anticorpos específicos contra as proteínas do VLB.

Após o isolamento e o cultivo do VLB, várias metodologias para a detecção de anticorpos por testes sorológicos foram desenvolvidas: Imunodifusão em gel de ágar – IDGA (MILLER & OLSON, 1972), fixação de complemento (MILLER & VAN DER MAATEN, 1976), soroneutralização, imunofluorescência, teste de inibição sincicial (FERRER *et al.*, 1976), radio-imunoensaio (MACDONALD & FERRER, 1976), ensaio imunoenzimático – ELISA (PORTELLE *et al.*, 1983; FLORENT, 1988).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um teste sensível e específico para o diagnóstico direto da infecção, mesmo antes dos anticorpos estarem presentes. Quando a prevalência da infecção é menor que 5%, a PCR é mais sensível que os testes de IDGA e ELISA. Essa técnica é bastante útil na diferenciação dos bezerros não infectados que apresentam anticorpos colostrais dos bezerros realmente infectados pelo VLB, bem como na seleção de bovinos doadores de sangue total para premonição (RADOSTITS *et al.*, 2002).

Durante a interação VLB-hospedeiro, a gp51 e a proteína estrutural p24 são os principais alvos da resposta imunológica e para elas são dirigidos a maior parte dos reagentes para fins diagnósticos (VAN DER MAATEN *et al.*, 1990; MERZA *et al.*, 1991). Anticorpos contra a gp51, no entanto, foram detectados com títulos, em técnicas de diagnóstico (IDGA, ELISA e *Western Blotting*), mais elevados do que a proteína p24 (GONZÁLEZ *et al.*, 2001).

Apesar das inúmeras técnicas citadas é importante ressaltar que o teste de referência utilizado no diagnóstico pela “Office International des Épizooties”, são os testes de IDGA utilizando soro bovino e ELISA para soro e leite bovino, que detectam anticorpos contra a glicoproteína do envelope viral de peso molecular 51 kDa, denominada gp51 (OIE, 2004). São utilizados como amostras o soro e leite (REICHEL *et al.*, 1998). A maioria das reações sorológicas ocorre com o antígeno glicoprotéico (ONUMA *et al.*, 1975).

Várias técnicas ELISA, seja competitiva ou indireta, estão em desenvolvimento. Alguns kits analisam amostras individuais de leite ou soro, como em outros é possível realizar amostras agrupadas de soro ou leite. Kits desenvolvidos na Austrália possuem sensibilidade analítica mínima validada contra soro padrão europeu (OIE, 2004).

A IDGA, quando comparada ao ELISA, apresenta menor sensibilidade para detectar infecção porque depende dos níveis de anticorpos induzidos pelo VLB (MAMMERICKX, 1978). Este fato foi demonstrado por MAMMERICKX *et al.* (1980) em bovinos inoculados experimentalmente, quando os níveis de anticorpos subiram e atingiram elevadas concentrações, onde o ELISA detectou a infecção mais precocemente que a IDGA.

2.7 DOENÇA CLÍNICA

O desenvolvimento de tumores nem sempre é precedido por LP, neste caso, a doença apresenta-se como leucose tumoral aleucêmica (RIET-CORREA *et al.*, 2001). Os sinais clínicos mais evidentes da LEB são: emagrecimento progressivo; paralisia progressiva dos membros posteriores; formações tumorais nos linfonodos superficiais, comum na região retrobulbar, onde causa exoftalmia uni ou bilateral (BARROS & FLORES, 1974); adenomegalia; incoordenação; baixa produção de leite; caquexia (MILLER & VAN DER MAATEN, 1992). FERRER (1980) & STOBBER, (1981), também citam manifestações circulatórias; respiratórias; digestivas; reprodutivas; urinárias e neurológicas

Os linfonodos atingidos podem estar constituídos de tecido normal junto a tecido neoplásico, firme e branco, muitas vezes circundando um foco necrótico translúcido e amarelo, podendo estar aumentado (BLOOD & RADOSTITS, 1991), quando os tumores estão localizados em órgãos internos os sinais são mal definidos (HÜBNER *et al.*, 1997).

Além dos nódulos linfáticos, outros tecidos freqüentemente são afetados, coração, abomaso, útero, rins, medula espinhal e olho (FERRER, 1980; STOBBER, 1981). STRAUB (1981), relatou a obstrução retal e raro aborto em períodos adiantados de gestação, quando tumores localizam-se nas paredes uterinas.

2.8 PREVALÊNCIA

Todas as raças de bovinos são suscetíveis à infecção pelo VLB, a qual raramente ocorre em animais com menos de dois anos de idade e aumenta a incidência com o aumento da idade (JOHNSON & KANEENE, 1992). A prevalência é mais alta em grandes rebanhos do que em rebanhos menores, sendo maior em

rebanhos leiteiros, comparada aos rebanhos de corte, provavelmente devido ao seu confinamento mais restrito e a idade média mais alta dos rebanhos leiteiros (RADOSTITS *et al.*, 2002).

A LEB foi erradicada na maioria dos países da comunidade europeia (Bélgica, Holanda, Dinamarca, Alemanha, França, Grã-Bretanha, Áustria, Finlândia (KNAPEN *et al.*, 1993; NUOTIO *et al.*, 2003), sendo encontrada esporadicamente em alguns países (Itália, Portugal, Lituânia, Letônia, Estônia (POLETTO, 2004).

Na Alemanha onde a doença foi originalmente descrita, estudos realizados em 1983, apresentaram uma taxa de 0,05% dos animais infectados pela LEB (TIERSEUCHENBERICHT, 1983; RADOSTITS *et al.*, 2002).

No Oriente médio em Israel BRENNER *et al.* (1986), identificaram em rebanhos um índice de 24,0% de animais infectados pelo VLB.

Na Austrália DIMMOCK *et al.* (1991), encontraram prevalência da infecção de (13,0% a 22,0%), na Nova Zelândia o percentual foi de 0,30% de animais reagentes ao VLB (PARRISH *et al.*, 1982).

Na América do Norte, a prevalência da LEB varia regionalmente (FERRER, 1980). Em estudos realizados nos Estados Unidos, a prevalência foi de 47,80% dos animais produtores de leite, enquanto que nos bovinos de corte apenas 6,7% dos animais apresentaram anticorpos contra o VLB (BURRIDGE *et al.*, 1981).

JOHNSON & KANNENE *et al.* (1985), relataram a prevalência de anticorpos para o VLB, empregando a técnica de IDGA no estado de Michigan. Foram examinadas amostras proporcionais do rebanho leiteiro de cada distrito. A prevalência encontrada nos 3.132 soros testados foi entre 24,0 e 36,0%.

Segundo a *National Animal Health Monitoring* (NAHMS) americana a prevalência da LEB aumentou de 10,0% em 1975 para 43,0% em 1997 (NAHMS, 1997).

Os estudos sorológicos de bovinos em estados americanos indicam o índice de prevalência dentro dos rebanhos variando de 0-100%. A doença não se dissemina rapidamente, e o número de rebanhos soro reagente ao teste de IDGA é geralmente pequeno. Contudo nos rebanhos infectados o número de animais soro positivos pode atingir 80,0% de positividade (RADOSTITS *et al.*, 2002).

No Canadá SAMAGH *et al.* (1982), estimaram uma prevalência nacional da LEB em torno de 19,7%, sendo 40,5% para bovinos de leite e 11,2% para bovinos de corte. Em Ontário um levantamento sorológico para o VLB foi realizado em 1.330 animais de 102 rebanhos. A prevalência individual da infecção foi de 23,0%, tendo 69,6% de rebanhos com um ou mais animais positivos (SARGEANT *et al.*, 1997).

Na América Central, Costa Rica, estudos revelaram uma prevalência de 27,80% de animais infectados pelo VLB (DUCREAU *et al.*, 1987).

Na América do Sul, resultados de levantamentos sorológicos demonstraram taxas de soro conversão para LEB de: 49,10% na Venezuela (MARIN *et al.*, 1978), 50,0% na Argentina (BRUNEL *et al.*, 1981), 1,4% (corte) e 12,1% (leite) no Uruguai (FLORES *et al.*, 1992) e 45,3% na Colômbia (ALFONSO *et al.*, 1998).

A importação de animais infectados tem sido incriminada como um dos fatores responsáveis pela entrada da doença e sua disseminação nos rebanhos (MODENA *et al.*, 1983). Em estudos FLORES *et al.* (1992), comprovaram que o índice de positividade dos animais importados maciçamente do Uruguai e Argentina na década de 70 certamente contribuiu significativamente para a difusão do VLB no Brasil. A importação de animais com alta linhagem genética dos Estados Unidos e Canadá também possuíram um papel significativo.

A presença da LEB ocorre em todo o rebanho brasileiro. Embora haja inúmeros estudos sobre a doença, sua distribuição tem demonstrado frequência variável de infecção nos rebanhos leiteiros (CAMARGOS *et al.*, 2002; LEITE *et al.*, 2004).

De acordo com Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística em 2007, o Brasil foi eleito o segundo maior produtor de bovinos no mundo, com um rebanho de 200 milhões de cabeças, atrás somente da Índia. Os maiores rebanhos bovinos estão no Mato Grosso representando (12,9%) do gado nacional, seguido de Minas Gerais (11,3%) e Mato Grosso do Sul (10,9%).

O percentual de animais soro positivos varia consideravelmente entre os estados: São Paulo (36,6%), Rio de Janeiro (54,2%), Minas Gerais – Zona da Mata (20,71%), Acre (9,7%), Rondônia (23,0%), Santa Catarina (2,04%), Rio Grande do Sul (23,5%) e Bahia (41,0%) (ALENCAR *et al.*, 1979; ROMERO *et al.*, 1981;

SANTOS *et al.*, 1985; ABREU *et al.*, 1990; MARTINS *et al.*, 1996; POLLETO *et al.*, 2004; MATOS *et al.*, 2005).

DINIZ *et al.* (1980), fizeram o primeiro registro de LEB no Paraná, confirmaram a presença da doença em bovinos de origem canadense por meio de exames clínicos e anátomo-patológicos.

KANTEK *et al.* (1983), analisaram rebanhos paranaense por técnica de IDGA, o soro de 695 bovinos, provenientes de 184 propriedades em 43 municípios. Foram encontrados 144 (20,7%) bovinos soro positivos para LEB e 40,7% das propriedades testadas foram consideradas positivas.

CARVALHO *et al.* (1996), investigaram na região de Londrina, Paraná, 985 soros de animais com aptidão de corte (Nelore) e leite (Holandesa) de 14 rebanhos. A prevalência obtida foi de 18,4% dos animais da raça holandesa positivos para o VLB e todos os animal da raça Nelore foram negativos. Analisando as propriedades 83,3% foram positivas para a infecção.

Estudo feito por ANDRADE *et al.* (1991), demonstraram a prevalência da LEB em rebanhos do estado de Goiás. Foram examinadas 670 amostras de soros sanguíneos de bovinos provenientes de 55 propriedades, localizadas em 18 municípios. Sendo 46,0% de animais reagentes ao VLB para a raça Holandesa, 36,5% para mestiços Holandês/Zebu, 39,1% para o gado comum, 25,0% para Gir e 13,2% para o Nelore. Conclui-se que o vírus da LEB está bastante difundido no rebanho goiano, principalmente no leiteiro.

Com relação à ocorrência da infecção viral em animais de diferentes faixas etárias, em granjas produtoras de leite B da região de campinas, encontraram crescentes taxas de soropositividade ao VLB pela IDGA variando de 35,6% (26/73) na faixa de um a dois anos, até 78,6% (33/42) nos animais acima de sete anos. BIRGEL *et al.* (1995)

MORAES *et al.* (1996), avaliaram, pela técnica de IDGA, rebanhos leiteiros do estado do Rio Grande do Sul. Foram coletadas 39.799 amostras de soro bovino de aptidão leiteira e de carne, provenientes de 4.200 propriedades rurais de 172 municípios. Concluíram que 3.645 (9,2%) das amostras testadas eram positivas. As análises estatísticas demonstraram uma prevalência média para o estado em torno de 12,0% dos animas e 29,0% do rebanho soro positivos.

MACHADO *et al.* (2003), avaliaram 661 amostras coletadas em 16 rebanhos leiteiros de quatro municípios da região de Manaus (Amazônia). Sendo 11 rebanhos positivos para o VLB, a prevalência global foi de 9,6%, após a exclusão dos animais com menos de seis meses de idade a taxa decaiu para 8,9% de animais positivos para LEB.

DEL FAVA & PITUCO (2004), relataram a ocorrência da LEB em bovinos nas regiões sul, sudeste, centro-oeste, nordeste e norte do Brasil (TABELA 2).

TABELA 2 – OCORRÊNCIA DE LEUCOSE ENZOÓTICA EM BOVINOS NAS REGIÕES SUL, SUDESTE, CENTRO-OESTE, NORDESTE E NORTE DO BRASIL, SEGUNDO AUTOR, ANO, LOCAL, TÉCNICA, RAÇA OU APTIDÃO ZOOTÉCNICA DOS ANIMAIS (CONTINUA)

Autores	Ano	Estado	Nº total de soros	Total de positivos	% de positivos	Técnica	Raça ou aptidão zootécnica dos animais
Região Sul							
KANTEK <i>et al.</i>	1983	PR	695	144	20,7	IDGA	Leiteira
CARVALHO <i>et al.</i>	1996	PR	374	69	18,4	IDGA	Holandesa
			611	0	0,0	IDGA	Nelore
LEUZZI JÚNIOR <i>et al.</i>	2003	PR	624	254	40,7	IDGA	Leiteira tipo B
SCARCI <i>et al.</i>	1980	RS	385	73	18,9	IDGA	Não foi citado
GOMES <i>et al.</i>	1985	RS	702	229	32,6	IDGA	Leiteira
FLORES <i>et al.</i>	1988	RS	639	91	14,2	IDGA	Leiteira
FLORES <i>et al.</i>	1990	RS	135	59	27,2	IDGA	Leiteira
MORAES <i>et al.</i>	1996	RS	39.799	3.645	9,2	IDGA	Leiteira
VAN DER LAAN <i>et al.</i>	1999	RS	19.774	3.225	16,3	IDGA	Leiteira
Região sudeste							
LEITE <i>et al.</i>	1984	MG	230	163	70,9	IDGA	Leiteira
MODENA <i>et al.</i>	1984	MG	1.274	517	40,6	IDGA	Leiteira
			1.652	254	15,6	IDGA	Corte
SANTOS <i>et al.</i>	1985	SP	317	90	28,4	IDGA	-
ROMERO & ROWE	1981	SP	1.444	769	53,3	IDGA	Leiteira
CUNHA <i>et al.</i>	1982	SP	746	201	26,9	IDGA	Mestiço, holandês e Zebu
ALENCAR FILHO	1978	SP	40	24	60,0	IDGA	Holandesa
ALENCAR FILHO <i>et al.</i>	1979	SP	1.013	361	5,6	IDGA	Leiteira e corte
BIRGEL <i>et al.</i>	1983	SP	292	157	53,8	IDGA	Leiteira
BIRGEL <i>et al.</i>	1988a	SP	462	243	52,6	IDGA	Leiteira tipo B
BIRGEL <i>et al.</i>	1988b	SP	1.722	774	44,9	IDGA	Leiteira
BIRGEL <i>et al.</i>	1991	SP	2.708	1.162	42,9	IDGA	Leiteira
ARITA <i>et al.</i>	1992	SP	2.187	355	16,2	IDGA	Leiteira
BIRGEL <i>et al.</i>	1994	SP	482	20	4,2	IDGA	Nelore
BIRGEL JUNIOR <i>et al.</i>	1995	SP	709	360	49,2	IDGA	Jersey
OLIVEIRA <i>et al.</i>	1997	SP	1.448	461	31,8	IDGA	Holandesa
MEGID <i>et al.</i>	2003	SP	1.193	618	47,4	IDGA	Holandesa, Nelore e mestiços

TABELA 2 – OCORRÊNCIA DE LEUCOSE ENZOÓTICA EM BOVINOS NAS REGIÕES SUL, SUDESTE, CENTRO-OESTE, NORDESTE E NORTE DO BRASIL, SEGUNDO AUTOR, ANO, LOCAL, TÉCNICA, RAÇA OU APTIDÃO ZOOTÉCNICA DOS ANIMAIS (CONCLUSÃO)

Autores	Ano	Estado	Nº total de soros	Total de positivos	% de positivos	Técnica	Raça ou aptidão zootécnica dos animais
Região Centro-Oeste							
ANDRADE & ALMEIDA	1991	GO	63	29	46,0	IDGA	Holandês
			416	159	36,5	IDGA	Mestiço, holandes e Zebu
			45	17	37,9	IDGA	Gir
			87	34	39,2	IDGA	Comum
			53	7	13,2	IDGA	Nelore
Região Nordeste							
TÁVORA & BIRGEL	1991	BA	1.084	174	16,1	IDGA	Leiteira
MELO <i>et al.</i>	1991	PE	195	45	23,1	IDGA	Holandesa
			323	27	8,4	IDGA	Mestiço, holandês e Zebu
SIMÕES	1998	PB	780	65	8,3	IDGA	Leiteira
SILVA	2001	PI	1.976	333	16,9	IDGA	Mestiço, holandês, Zebu e raça pé-duro
ABREU <i>et al.</i>	1994	CE	3.430	842	24,5	IDGA	Zebu x raças taurinas
Região Norte							
ABREU <i>et al.</i>	1990	RO	1.060	244	23,0	IDGA	Carne, leite e misto
		AC	1.060	103	9,7	IDGA	Carne, leite e misto
MOLNÁR <i>et al.</i>	1999	PA	668	174	26,0	IDGA	Leiteira e corte
		PA	721	359	49,8	IDGA	Leiteira e corte
CARNEIRO <i>et al.</i>	2003	AM	604	58	9,6	IDGA	Leiteira

*IDGA = Imunodifusão em gel de ágar **ELISA=Ensaio Imunoenzimático

FONTE:DEL FAVA & PITUCO (2004)

2.8 ASPECTOS ECONÔMICOS E SANITÁRIOS

Vários autores de diversos países descreveram sobre a importância econômica da LEB, entretanto a literatura dispõe de relatos inconstantes, ou até mesmo conflitantes quanto aos efeitos da infecção pelo vírus em bovinos. Alguns autores relacionaram a causa da queda da produção leiteira e o intervalo de partos em rebanhos devido à infecção pelo VLB, (BRENNER *et al.*, 1990; JACOBS *et al.*, 1992; THOMPSON *et al.*, 1993; SARGEANT *et al.*, 1997 e D'ANGELINO *et al.*, 1998; OTT *et al.*, 2003). Porém outros trabalhos não encontraram relação na presença do vírus no rebanho com a produção de leite (BURRIDGE *et al.*, 1982; JOHNSON & KANEENE, 1991; VANLEEUEWEN *et al.*, 2000).

REINHARDT *et al.* (1988), observaram em um rebanho do Chile de 137 vacas com 30% de prevalência de leucose, que a doença não teve qualquer influência sobre aborto, mastite ou infertilidade, porém relataram uma perda média de produção de 156 kg de leite nos animais soro positivos, quando comparados à animais soronegativos em lactação ajustada à 305 dias, equivalente a 74 dólares por ano.

MULLER & WITTMANN (1990), estimaram uma perda em um rebanho com VLB de 3,2 milhões de marcos alemães por ano, na região de Osterberg, leste da Alemanha. Com o controle da doença foram poupados 1,7 milhões de marcos ou 69 marcos por vaca.

No Brasil D'ANGELINO (1991), relacionou reprodução, descarte de animais e a produção diária de leite em animais de segunda, terceira e quarta lactação, com animais infectados pelo VLB. Conclui-se que estes animais apresentaram uma queda de produção leiteira de 11% quando comparados aos animais soro negativos. O autor não encontrou influência da infecção viral sobre fatores reprodutivos, como alterações nos intervalos entre partos, coeficiente de natalidade e descarte de animais.

EMANUELSON *et al.* (1992), relataram que o índice de abate foi mais alto e a produção de leite inferior nos rebanhos com VLB em comparação com os rebanhos livres da infecção, encontraram um aumento significativo no intervalo de partos, além de um maior risco na ocorrência de cistos ovarianos.

De acordo com os resultados encontrados por DA *et al.* (1993), nos Estados Unidos em um período mínimo de três anos, as perdas anuais causadas pelo VLB na pecuária leiteira foram estimadas em 86 milhões de dólares, sendo este valor diretamente relacionado com a diminuição na produção de leite e gordura em bovinos soro positivos. A perda anual estimada na produção de leite é de 366 Kg para vacas com LP em dois anos e 1.204 Kg para vacas com LP por três anos. As perdas econômicas foram estimadas com base no número total de vacas com LP, preço do leite, média de rendimento do leite, renda líquida por vaca e perda na produção de leite nas vacas com LP.

Economicamente, a infecção pelo VLB é responsável pelas perdas diretas, ligadas a queda na produtividade e intervalos de reprodução e também pelo embargo ao comércio internacional de animais e de seus produtos derivados. As perdas indiretas incluem ainda o aumento nos gastos com a reposição de animais e gastos com medicamentos e veterinários. Estudos realizados sobre o impacto econômico que a doença causa na indústria leiteira americana revelaram que o linfossarcoma pode ser responsável por um prejuízo de mais de 16 milhões de dólares por ano (PELZER, 1997).

A *National animal Health Monitoring System* (NAHMS) relatou uma perda de produção de leite de 59 dólares anual por vaca infectada comparado com rebanho não infectado com VLB, representando queda 3% na produção e 218 Kg de leite por vaca. Utilizando-se uma curva de oferta e demanda, foi calculada uma perda estimada de 285 milhões de dólares para produtores e 240 milhões para consumidores, tendo uma perda total para economia de 525 milhões. A presença do VLB diminui a produção do leite e promoveu um desequilíbrio de preço no mercado, menor quantidade maior oferta. A perda econômica não foi baseada apenas na soma total de excedentes, mas também por uma perda sentida por consumidores e produtores (OTT *et al.*, 2003).

Na Virginia estudos relataram o custo médio de casos de linfossarcoma, sendo mais de 400 dólares em um rebanho com 50% de vacas soro positivas, a taxa de linfossarcoma foi de cerca de 2 casos por 300 vacas leiteiras. (RHODES *et al.*, 2003).

LOSINGER (2006), fez uma análise do impacto econômico do vírus da leucose no rebanho americano. A presença do vírus implicou uma menor produção de leite, reduzindo desta forma o consumo excedente em aproximadamente 2,7 a 2,3 bilhões de dólares, resultando em uma perda parcial de 720 a 560 milhões para a economia em 1996. A maior da perda econômica por parte dos consumidores foi transferida para os produtores, sendo em aproximadamente 2,0 a 1,8 bilhões como resultado da diminuição da produção de leite.

Outros fatores de prejuízos decorrentes desta doença que podem ser citados são: condenação de carcaças em frigoríficos com serviço de inspeção veterinária (DIGIACOMO, 1992); aumento no intervalo de partos (JACOBS *et al.*, 1995); restrição a exportação de sêmen e embriões de animais soro positivos, diminuição da produção de leite e da gordura do leite (OIE, 2009), e o aumento da suscetibilidade do gado infectado a outras doenças (RADOSTITS *et al.*, 2002).

2.9 CONTROLE E PREVENÇÃO

Atualmente não existem vacina, nem tratamento efetivo para controle da doença. Desta forma, a prevenção é realizada através de medidas profiláticas, controle e erradicação, sendo importante e vantajosa economicamente para produtores.

Um número crescente de países exige certificado negativo de LB para importação de animais, sendo a maioria pertencente à Comunidade Européia, que há alguns anos sustenta uma campanha de erradicação (RADOSTITS *et al.*, 2002).

O teste sorológico negativo do rebanho é obrigatório em países como a Áustria, Dinamarca, Irlanda, Holanda, Irlanda do Norte, Suécia e Alemanha (JOHNSON; KANEENE, 1992; FENNER *et al.*, 1993). No Brasil não existe nenhum programa oficial de controle da doença, entretanto o Ministério da Agricultura colabora com tentativas de programas de controle, através do impedimento de compra e entrada no país de animais sorologicamente positivos para VLB.

A doença pode ser erradicada de um rebanho, país ou mesmo controlada em baixo nível, as opções são dependentes da prevalência da infecção, valor dos animais e se possível apoio governamental com indenização para descarte de vacas soro positivas (RADOSTITS *et al.*, 2002).

Os principais fatores para controlar a propagação do VLB dentro de um rebanho são: orientação e cuidado com técnicas de manejo, identificação dos animais reagentes ao VLB e não reagentes, através de diagnóstico preciso e a escolha do procedimento economicamente viável para o controle da doença. O teste sorológico é indicado para todos os animais com mais de seis a oito meses de idade para pesquisa de anticorpo VLB, considerando positivo o rebanho que contiver no mínimo um animal reagente (PELZER *et al.*, 1993).

A eficiência de tal controle depende da acurácia do teste utilizado para identificação dos animais infectados e a repetição do teste em um intervalo de quatro meses, para que animais portadores do vírus, mas em período de latência tenham tempo de soro converter e serem identificados (WILESMITH *et al.*, 1980; RADOTITS *et al.*, 2002). Segundo o resultado pode-se fazer a remoção de animais soro positivos ou segregação, principalmente quando o objetivo é a erradicação da doença.

A remoção dos animais positivos é indicada para rebanhos menores ou com poucos animais infectados, entretanto para rebanhos com alta prevalência a opção mais apropriada é a segregação do rebanho em dois lotes: positivos e negativos. Os rebanhos devem ser geridos de forma independente, o rebanho positivo pode continuar com sua função comercial normal e o rebanho negativo serve como reposição de animais soro positivo que podem ser eliminados gradativamente. A circulação dos animais deve ser somente em uma direção, de negativo para positivo. Um dos problemas da segregação consiste em gastos com a duplicação das instalações e o aumento da responsabilidade e cuidados (PELZER *et al.*, 1993).

É possível eliminar a infecção do rebanho após dois a três ciclos de testes IDGA, e a remoção de animais reagentes, com intervalos de 30 a 60 dias para detectar possíveis casos adicionais (JOHNSON & KANEENE 1992; SHEITIGARA *et al.*, 1996).

Outra alternativa para o controle do VLB é a adoção de medidas corretivas de manejo, na tentativa de evitar a disseminação. Estudos feitos por SPRENCER *et al.* (1991), em um rebanho leiteiro, revelaram que após adotar todas as medidas corretivas de manejo rigorosamente, comparando a prevalência pré (1987) e pós intervenção (1989), houve uma queda na incidência de animais contaminados, de

44% para 17% no final do período. Uma grande desvantagem é o tempo necessário para observar resultados favoráveis ou uma queda na prevalência dos animais infectados.

2.10 ANTICORPOS

Anticorpos são proteínas naturalmente produzidas por células B e plasmócitos, com conformação específica para reconhecer e neutralizar substâncias estranhas ao organismo (bactérias, vírus, parasitas, ou células tumorais). Um anticorpo reconhece um alvo específico (antígeno), presente nas células estranhas ao organismo. Cada anticorpo dispõe de dois sítios, chamados de parátomos, que ligam-se a uma parte específica do antígeno, denominada epítipo. Esta ligação ocorre com alta afinidade e especificidade, de forma a eliminá-los ou destruí-los (ABBAS *et al.*, 2008).

2.10.1 Imunoglobulinas

Cada molécula de Anticorpo possui semelhança quanto à estrutura global, o que explica certas características físico-químicas comuns, tais como a carga e a solubilidade. Esta estrutura comum denominada de imunoglobulina (Ig) é formada por duas cadeias leves (C_L) ligadas a duas cadeias pesadas (C_H) idênticas, unidas mutuamente por pontes dissulfeto (cada uma com aproximadamente 24 e 55 a 70 kDa respectivamente). A cadeia pesada apresenta uma região chamada anel, situada na divisão dos fragmentos, Fab e Fc, permitindo maior flexibilidade à molécula (FIGURA 4). Ambas as cadeias contêm uma série repetitiva de unidades homólogas (~110 aminoácidos), que se enovelam independentemente formando assim o domínio de Ig, estes domínios possuem duas camadas de fita β -pregueadas antiparalelas, com três ou quatro segmentos polipeptídicos por camada. As moléculas que contêm este domínio são consideradas integrantes à família de Imunoglobulina (ABBAS *et al.*, 2008).

As classes de moléculas de Anticorpo são também denominadas de isótipos (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM). O isótipo IgG em bovinos pode ser dividido em três subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 e duas cadeias leves K e λ (SYMONS *et al.*, 1989; RABBANI *et al.*, 1997). As cadeias pesadas de todas as moléculas do anticorpo de

um isótopo compartilham extensas regiões de identidade na sequência dos aminoácidos, mas diferem dos anticorpos pertencentes a outros tipos ou subtipos. As cadeias pesadas são designadas pela letra do alfabeto grego correspondentes ao isotipo geral do anticorpo, esta nomenclatura segue o padrão estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (WHO,1978).

Os domínios N-terminais das cadeias pesadas e das leves formam as regiões variáveis (R_V), que se diferenciam entre os anticorpos de diversas especificidades. As R_V são formadas por V_L e V_H , cada uma contendo três regiões hiper-variáveis separadas, com cerca de 10 aminoácidos que estão localizados em uma superfície planar desta região, formando o sítio de ligação com o antígeno. As regiões constantes (R_C) possuem uma C_L e três ou quatro C_H , que são semelhantes nos anticorpos da mesma classe (isótopos) e subclasses, mas diferem em anticorpos de diferentes classes e subclasses. As R_C são responsáveis por funções efetoras (Sistema complemento, ligação e transporte através da membrana etc) (ABBAS *et al.*, 2008).

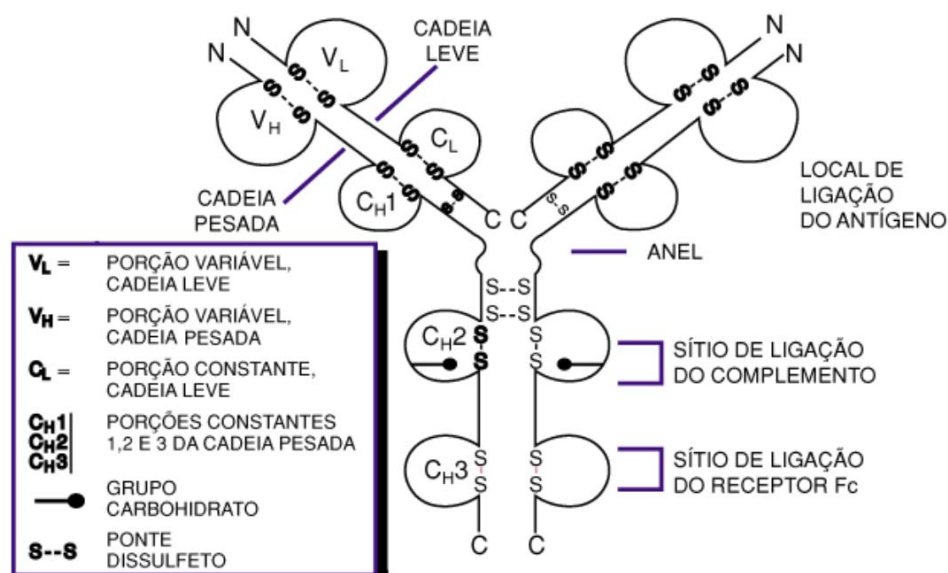


FIGURA 4 – DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE UMA MOLÉCULA DE IMUNOGLOBULINA (IG).
FONTE: ABBAS *et al.* (2008)

Os genes R_C e R_V não estão juntos no DNA embrionário e nas células iniciais do embrião, mas estão muito associados no DNA das células produtoras de anticorpos, estes genes são translocados durante a diferenciação do linfócito, em

pré-célula B e célula B. Estas células se dividem e se diferenciam em células produtoras de anticorpos e células de memória, no período da ontogênese (FIGURA 5). O número de genes da região variável na linhagem germinativa é muito pequeno para ser a única fonte de diversidade dos anticorpos, portanto parte desta diversidade é gerada durante, o tempo de vida do animal, no período de diferenciação de seus linfócitos (MILSTEIN, 1984).

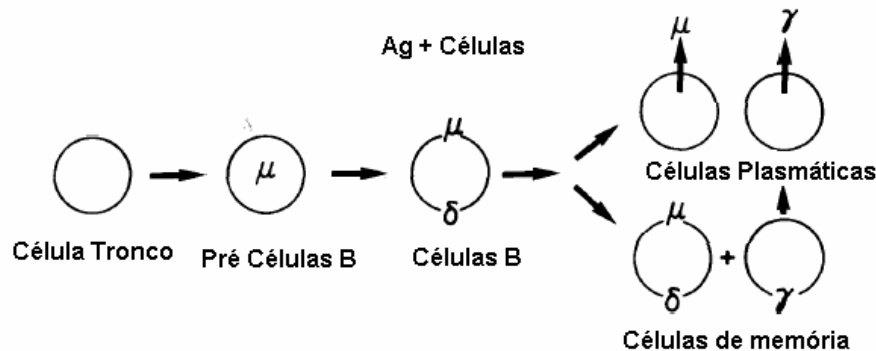


FIGURA 5 - ONTOGÊNESE DO LINFÓCITO B.
FONTE: MILSTEIN (1984)

2.10.2 Anticorpos Monoclonais

Anticorpos monoclonais são anticorpos produzidos por um único clone de um linfócito B parental sendo, portanto idênticos em relação às suas propriedades físico-químicas e biológicas.

Antes da década de 60, apenas anticorpos policlonais eram usados, esses são dirigidos para uma diversidade de antígenos ou diferentes partes de um único antígeno. Não era possível cultivá-los *in vitro*, deste modo eram colhidos a partir de soro de animais imunizados (ABBAS *et al.*, 2008).

Os estudos sobre AcMc deram início em 1960 com o trabalho de BARSKI no laboratório de virologia e cultivo de tecidos do Instituto de Gaustave Roussy (França). BARSKI concluiu que durante os experimentos com culturas de duas populações de células tumorais, de diferentes espécies ou tecidos, ocorria a formação de uma nova linhagem de células, com características morfológicas e de crescimento padrão, diferentes das células mãe. O núcleo destas novas células continham um número de cromossomos igual a soma total de cromossomos das duas células mãe. Entretanto a frequência de células fusionadas era muito baixa,

entre 10^{-4} e 10^{-6} . Neste período houve um grande aumento de pesquisas utilizando fusão de células animais.

Em 1965, a metodologia de fusão espontânea foi superada com a fusão da linhagem de célula humana derivada de um câncer cervical (HeLa) e células tumorais de camundongo, utilizando como agente fundente o vírus inativo Sendai, com radiação U.V (HARRIS & WATKINS, 1965). Entretanto o vírus Sendai inativado teve várias desvantagens como fusógeno incluindo a variabilidade e o custo.

PONTECORVO (1975), mostrou que protoplasmas de plantas poderiam ser fundidos rapidamente se tratados com PEG.

Em 1975, o experimento de KÖHLER & MILSTEIN demonstrou a possibilidade de se obter fusão de linfócitos B e células de mieloma de camundongos com a utilização de PEG. As células híbridas formadas cresciam ilimitadamente, produzindo grandes quantidades de anticorpos homogêneos e com alta especificidade predeterminada para um epítipo. O artigo foi publicado na revista *Nature* e ganhou o prêmio Nobel de medicina, no ano de 1984, junto com o dinamarquês Niels Kaj Jerne.

A fusão entre linfócitos e mielomas desenvolve-se em dois estágios: desestabilização temporária das membranas plasmáticas por um reagente químico, formando uma célula simples com dois ou mais núcleos e fusão das membranas nucleares com formação de heterocário (ABBAS *et al.*, 2008).

As células normais sintetizam nucleotídeos e timidilato por uma via chamada via de *novo*, na qual se utiliza fosforibosil pirofosfato e uridilato. No processo de síntese ocorre a transferência de um grupo metil ou formil de um tetrahidrofolato ativado. Os mielomas utilizados na fusão são mutantes com deficiência na enzima hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (HGPRT) e possuem somente a via de *novo* para a síntese de ácidos nucleicos. Estes mutantes são selecionados *in vitro* através do tratamento prévio com 8-azaguanina, uma droga antimetabólica que bloqueiam a reativação do tetrahidrofolato inibindo a síntese de purinas e timidilato, substâncias que são necessárias para a síntese de DNA (FIGURA 6) (ABBAS *et al.*, 2008).

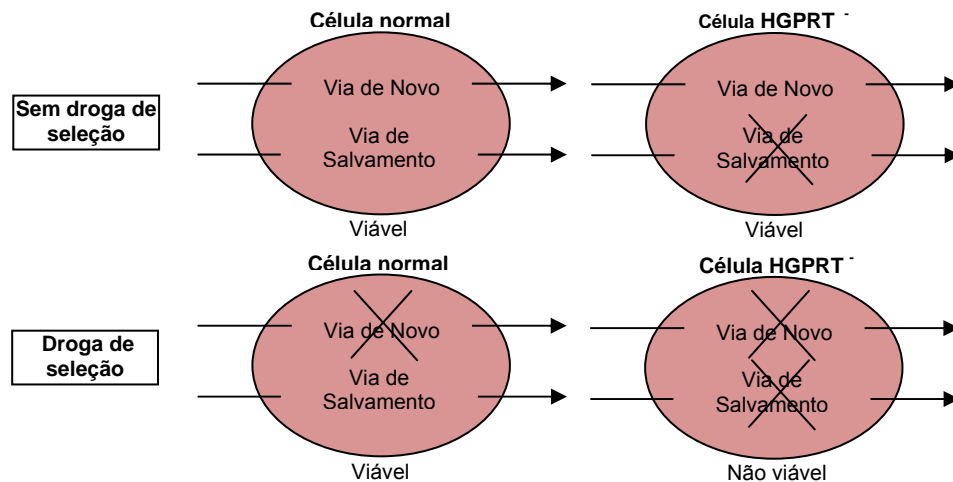


FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO DA VIA DE SÍNTESE DE NUCLEOTÍDEOS E DROGA DE SELEÇÃO PARA HIBRIDOMAS VIÁVEIS.
FONTE: ADAPTADO HARLOW & LANE (1988).

As células deficientes em HGPRT quando tratadas com HAT, meio de cultura com aminopterina, morrem. A aminopterina é um agonista do ácido fólico que bloqueia a via de *novo* para síntese de DNA. As células normais, derivadas do baço do animal, ao contrário das células de mieloma, possuem a imunoglobulina específica desejada e produzem a enzima HGPRT e timidina quinase (TK). Ou seja, possuem duas vias para síntese de ácidos nucleicos: via de *novo* e via de salvamento. Como a fusão é aleatória existe a possibilidade de fundir mieloma com linfócitos B, linfócitos B com linfócitos B e mieloma com mieloma, desta forma as células híbridas são selecionadas pelo HAT, que é utilizado como meio de cultivo pós-fusão. Assim, as células do baço que não fusionaram mesmo tendo a via de salvamento morrerão, pois seu tempo de vida em meio de cultura é de no máximo sete dias (FIGURA 7). Somente ficarão viáveis as células híbridas sobreviveram (HARLOW & LANE, 1988; ABBAS *et al.*, 2008).

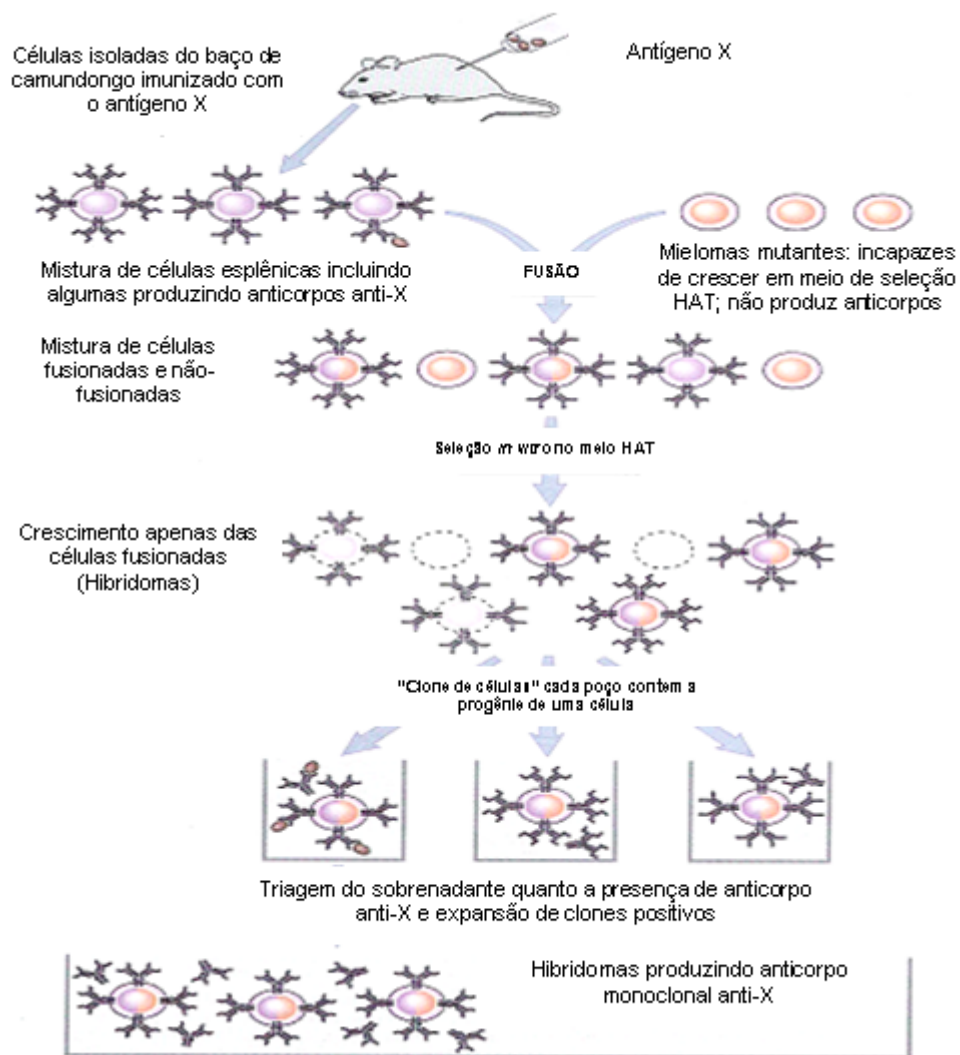


FIGURA 7 – PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS PELA TECNOLOGIA DE HIBRIDOMAS.
FONTE: ADAPTADO KUBY (2002).

Mesmo nas mais eficientes fusões apenas cerca de 1% das células são fundidas e destas cerca de 1 em 10^5 formam híbridos viáveis (HARLOW & LANE, 1988).

A linhagem de mielomas utilizada em fusões surgiu pela primeira vez em camundongos BALB/c, através de uma injeção intraperitoneal de óleo mineral por POTTER (1972), denominada MOPC21, produzindo células tumorais. As células foram selecionadas através de sucessivas clonagens de onde surgiu a linhagem P3-X63Ag8. Estas foram fundidas com células do baço de camundongos BALB/c, imunizados com hemácias de carneiro, dando origem ao primeiro hibridoma obtido com sucesso (KÖHLER *et al.*, 1975). Outras clonagens originaram a linhagem Sp2/O-

ag14 (SHULMAN *et al.*, 1978) (FIGURA 8). Mielomas derivados de BALB/c vem se tornando as células mais comuns para a realização de fusões. As linhagens de mielomas de BALB/c mais utilizadas são: Sp2/0-Ag14 (KÖHLER & MILSTEIN, 1975) e X63Ag8.653 (KEARNEY *et al.*, 1979) (TABELA 3). Estes mielomas não possuem capacidade de secreção de anticorpos, portanto não há produção de hibridomas que secretem mais de um tipo de anticorpo. As células do baço são isoladas de camundongos imunizados, da mesma linhagem de origem dos mielomas (HARLOW & LANE, 1988).

A tecnologia de hibridomas ainda tem se mantido na maior parte inalterada utilizando protocolos de MISTEIN (1975), WESTERWOUTD (1985) e FRENCH *et al.* (1986). A eletrofusão é outra técnica utilizada, consiste em utilizar pulsos elétricos curtos para promover a fusão, em condições ótimas tem sido possível aumentar a frequência de fusão cerca de 80x quando comparado ao método tradicional de utilização do PEG, mas é restrita devido a elevados custos, eficácia e disponibilidade (SCHIMITT *et al.* 1989).

Anticorpos monoclonais são poderosas ferramentas em diversos campos da biologia celular, fisiologia, biosseparação, biologia molecular, imunologia, microbiologia dentre outras. Estes possuem alta especificidade, homogeneidade, afinidade e respondem a apenas um epítipo de um antígeno. Estas biomoléculas possuem ausência de anticorpos inespecíficos e maior facilidade de caracterização, sendo referência em:

- Identificação de marcadores fenotípicos para tipos celulares no estudo de doença autoimune (diabetes de Mellitos I, artrite reumatóide, esclerose múltipla, entre outras) e imunossupressão, para evitar rejeição do organismo ao órgão transplantado. Os AcM ligam-se aos receptores de membranas produzidos por células T, impedindo que estes detectem o órgão exertado (STEINMAN *et al.*, 1981).

- Composição de conjuntos de reativo para diagnóstico e terapia de doenças infecciosas e imunoterapias (BIRTLES *et al.*, 1990).

- Oncologia, com finalidade terapêutica, AcMc são dirigidos a antígenos específicos de várias linhagens tumorais, não-coligados ou ligados a radioisótopos (radioimunoterapia). Utilizam-se também anticorpos monoclonais ligados a

radioisótopos na detecção e localização de células neoplásicas (radioimunodiagnóstico) (MOFFAT *et al.*, 1996).

- ELISA, de todos os métodos utilizados para fins de diagnóstico é provavelmente o teste mais prático, sendo sensível, simples e de fácil realização em larga escala. A purificação do antígeno VLB utilizado para o ELISA é o fator mais importante, que determina a qualidade do teste, para distinção e clareza entre animais soro positivos e soronegativos. Os anticorpos monoclonais contra a gp51 revelaram 8 epítomos, 3 dos quais são reconhecidos por anticorpos neutralizantes e um por um citolítica anticorpo (BURNY *et al.*, 1985).

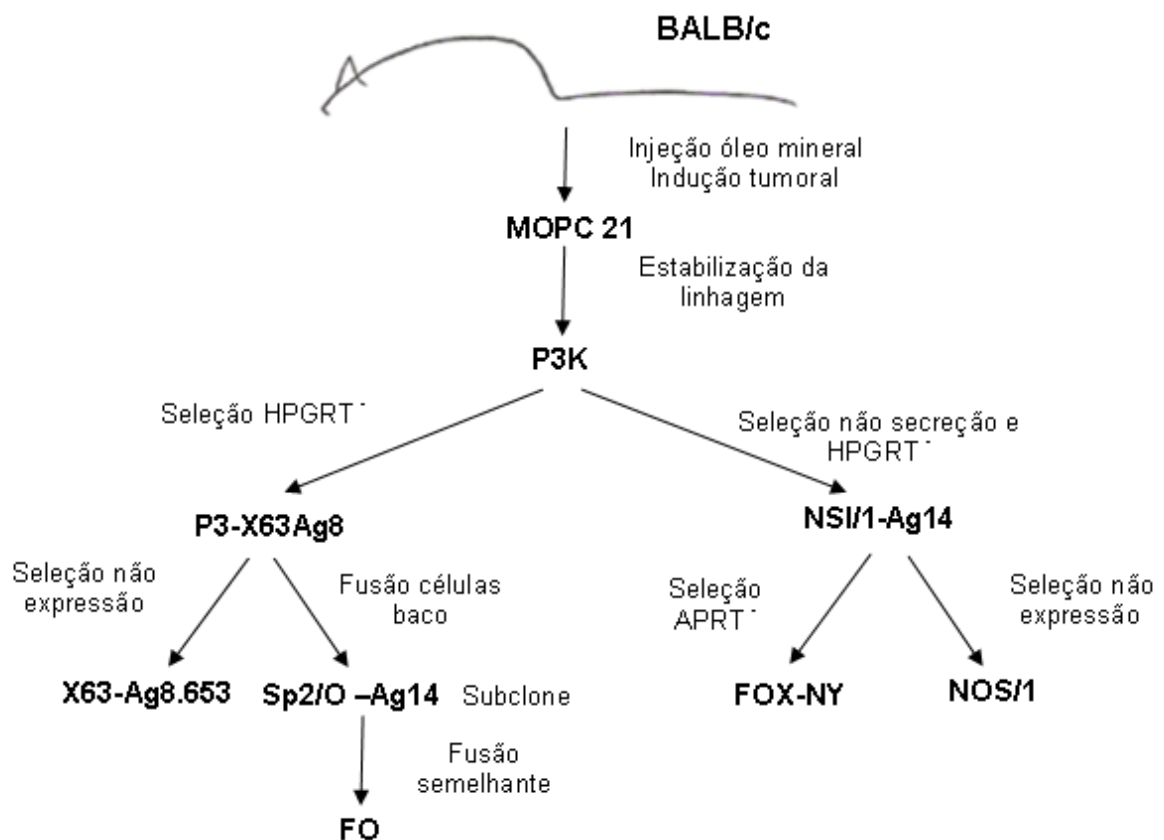


FIGURA 8 – ÁRVORE DA FAMÍLIA DE MIELOMA.
FONTE : ADAPTADO HARLOW & LANE (1988).

TABELA 3 – PRINCIPAIS LINHAGENS DE MIELOMAS UTILIZADAS EM PROCESSOS DE FUSÃO

Linhagem celular	Referência	Origem	Cadeia expressa	Comentário
Linhagem de camundongo				
P3-X63Ag8	Köhler & Milstein (1975)	P3K	γ 1, κ	Não recomendado
X63Ag8.653	Kearney et al. (1979)	P3-X63Ag8	-	Recomendado
Sp2/0-Ag14	Köhler & Milstein (1976) Shulman et al. (1978)	P3-X63Ag8 X BALB/c	-	Recomendado
F0	de St. Groth and Scheidegger (1980)	Sp2/0-Ag14	-	Recomendado
NSI/1-Ag4-1	Köhler et al. (1976)	P3-X63Ag8	Kappa	Recomendado
NOS/1	Galfre and Milstein (1981)	NSI/1-Ag4-1	-	Recomendado
FOX-NY	Taggart and Salmloff (1984)	NSI/1-Ag4-1	Kappa (?)	Recomendado
Linhagem de rato				
Y3-Ag1.2.3	Galfre et al. (1979)	Y3	Kappa	Não recomendado
YB2/0	Kilmartin et al. (1982)	YB2/3HL	-	Recomendado
IR98F	Bazin (1982)	LOU/c rats	-	Recomendado

FONTE : ADAPTADO HARLOW & LANE (1988).

3 MATERIAL E MÉTODOS

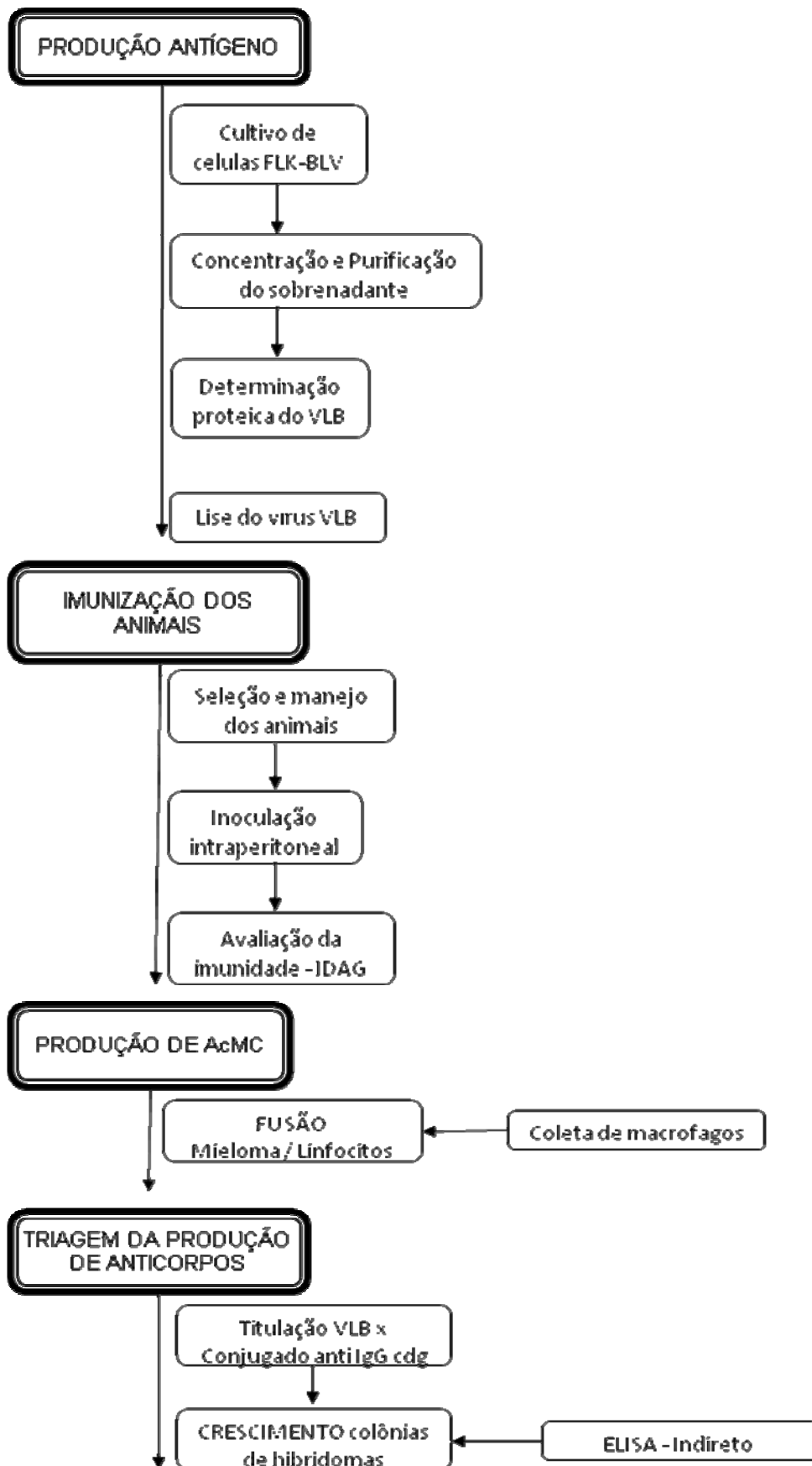
Visando obter anticorpos monoclonais anti gp51 do VLB, foram realizadas etapas de produção de antígeno, produção de AcMc, caracterização destes monoclonais e estudo de estabilidade. No quadro 1 é apresentado um fluxograma com todas as etapas de produção e caracterização dos AcMc, sendo descrito a seguir cada processo utilizado.

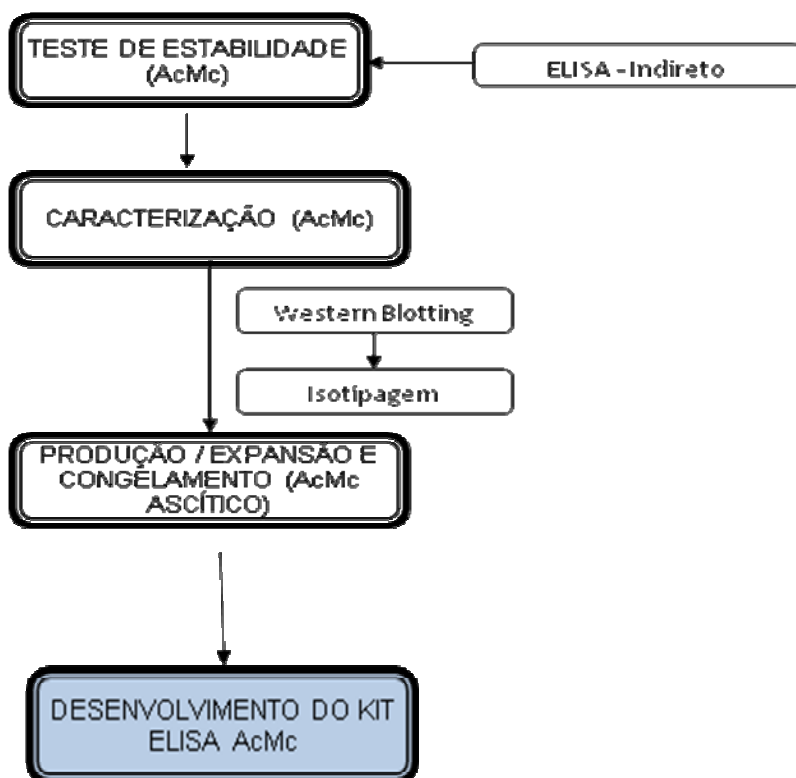
3.1 PRODUÇÃO DO ANTÍGENO

3.1.1 Cultivo de células FLK infectadas com VLB

No desenvolvimento deste trabalho para a produção do antígeno utilizou-se o protocolo padrão do TECPAR de produção de antígenos, com modificação no volume de meio de cultura utilizado. A quantidade de meio padrão utilizada em garrafa de cultivo 150 cm² de superfície é de 40 mL, porém neste processo foi utilizado 25 mL.

A linhagem de células FLK utilizada foi proveniente da EMBRAPA de Concórdia, no estado de Santa Catarina, sendo armazenada no banco de células do TECPAR. Uma ampola de FLK-BLV foi retirada do botijão de nitrogênio líquido (-196 °C) e rapidamente colocada em banho-maria, à temperatura de 37 °C para descongelamento rápido das células. O conteúdo da ampola foi transferido para um tubo de centrifuga contendo 10 mL de meio de crescimento F10 199 (MC) (ANEXO 2), e centrifugado a 800g durante 10 minutos para formação do sedimento celular. O sobrenadante contendo Dimetilsulfóxido (DMSO), reagente de congelamento e tóxico para as células em meio de cultura, foi descartado. O sedimento foi ressuspenso, e transferido para garrafa 75 cm² de superfície contendo 20 mL de MC. Manteve-se a cultura em estufa 5% CO₂ a 37 °C até formação completa da monocamada, aproximadamente 48 horas após o início do processo de incubação. Todos os cultivos celulares foram incubados nas mesmas condições.





QUADRO 1 – FLUXOGRAMA DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS.

Estando a monocamada fechada coletou-se o sobrenadante e em seguida para o repique celular foi adicionado 3 mL de tripsina com finalidade de lavagem do meio de cultura excedente. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se mais 5 mL de tripsina seguido de 15 minutos de incubação a 37°C, até desprendimento completo das células da garrafa. As células foram homogeneizadas com 10 mL de MC com 5% de soro fetal bovino (SFB) para neutralização da tripsina e dissolução dos grumos celulares, foram adicionadas em garrafa 150 cm² e o meio foi completado até o volume final de 25 mL. Este processo de repique celular foi realizado por vezes consecutivas até a obtenção de 2000 mL.

Neste estudo utilizou-se como matéria prima a suspensão viral obtida pela colheita do sobrenadante das células FLK infectadas com VLB. O sobrenadante FLK-BLV foi clarificado através de centrifugação a 14.800g por 30 minutos à 4 °C e submetido à concentração no *Labscale TFF System* (Millipore).

3.1.2 Concentração do sobrenadante FLK-BLV

Previamente à realização da concentração do sobrenadante FLK-BLV em *Labscale*, foi feita uma lavagem da membrana de polietersulfona (Pellicon XL – Millipore 30 kDa), com água Milli-Q, seguida de PBS conforme protocolo do fabricante. O objetivo da lavagem foi de recuperar a permeabilidade e o equilíbrio osmótico, assim como remover possíveis contaminações e resíduos químicos.

Após a lavagem, a amostra com o volume inicial de 2000 mL foi filtrada mantendo a taxa de recirculação entre 0,03 à 0,05 L/min e uma pressão de aproximadamente 3,8 (psi) até o volume de 72 mL que posteriormente foram submetidos a ultracentrifugação.

As soluções para preparo do antígeno estão descritas no (ANEXO 8).

3.1.3 Purificação do sobrenadante FLK-BLV concentrado

Para cada 12 mL de sobrenadante concentrado utilizou-se 3 mL de sacarose 30%. O sobrenadante foi cuidadosamente adicionado sobre a sacarose sem que houvesse turbulência em sua superfície. Em seguida os tubos foram submetidos à centrifugação (Beckman) de 40.000g durante duas horas a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os tubos permaneceram por alguns minutos invertidos, para que ficassem completamente secos. Sobre o sedimento foram adicionados 300µL de tampão TEN, e a amostra foi armazenada a 4°C. Após 24 horas de repouso o material precipitado foi ressuspensionado com uma micropipeta 40 vezes, e armazenado a -80°C, até a posterior dosagem de proteínas.

3.1.4 Determinação protéica do VLB

Uma alíquota do material obtido pela ultracentrifugação foi reservada para concentração protéica visando calcular a dose a ser administrada aos animais para imunização. Foi utilizado o método físico de absorção de ondas ultra-violeta (Espectrofotômetro Metrolab 1700), onde as leituras de absorvância foram realizadas em comprimento de ondas de 260 nm e 280 nm.

$$(DP) = (1,55 \times \text{leitura } 280\text{nm}) - (0,76 \times \text{leitura } 260\text{nm}) \times 50$$

$$(DP) = (1,55 \times 0,258) - (0,76 \times 0,181) \times 50$$

$$(DP) = 13,11 \text{ mg/mL}$$

3.1.5 Lise do vírus VLB

O vírus foi lisado com tampão de lise na proporção 1:1, seguido de incubação à temperatura de 45°C durante 30 minutos. Este processo permitiu a exposição das proteínas do capsídeo viral. O vírus lisado foi utilizado na inoculação em camundongos.

3.2 IMUNIZAÇÃO DOS ANIMAIS.

3.2.1 Seleção e manejo dos animais

Para as imunizações foram utilizadas dez fêmeas de camundongos da linhagem BALB/c (Suiss) de colônia *Inbread* (SPF), com idade aproximada de 21 dias. Os animais utilizados foram provenientes do biotério da USP e ficaram confinados no biotério do TECPAR em duas gaiolas (5 animais cada) durante o período experimental das imunizações.

Todos os procedimentos relacionados ao manejo dos animais e a coleta de material foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná (CEEa/UFPR), processo nº 23075.029322/2007-47, certificado 250.

3.2.2 Inoculação intraperitoneal

Foram imunizadas dez fêmeas com o vírus *in natura* e com o vírus tratado lisado. Cada animal recebeu uma dose inicial (dia 0) de 100 µg de Antígeno *in natura* com adjuvante de *Freund* completo (DIFCO Laboratories) na proporção de 1:2, sendo o volume final de 100 µL inoculado por camundongo. A emulsão de antígeno formada foi inoculada via intraperitoneal, com o uso de uma agulha de calibre 0,38x13 mm e introduzida em profundidade de aproximadamente 1,8 cm na

cavidade peritoneal. No dia 15 os animais receberam nova imunização compostas do antígeno *in natura* mais adjuvante incompleto de *Freund* (Sigma Chemical Company), e nos dias 30, 45 e 60 foi utilizado o vírus lisado, mantendo as mesmas proporções.

3.2.3 Avaliação da imunidade humoral dos camundongos para o vírus VLB-Lis por imunodifusão

Ao término das cinco imunizações foram colhidas amostras de sangue total, por punção cardíaca, dos animais inoculados, utilizando uma agulha 25x7 mm e o sangue foi armazenado em microtubos. As amostras foram mantidas em temperatura de 25°C, para facilitar a retração do coágulo e em seguida centrifugadas durante 15 minutos em velocidade de 1000g, separando o soro do coágulo.

A avaliação da imunidade foi realizada utilizando placa com 6 cm de diâmetro contendo 7 mL de gel de ágar (ANEXO 9). Os poços foram perfurados com um molde padrão de aço inoxidável do tipo “roseta” que dispõe de sete furadores de 4 mm de diâmetro distanciados, no máximo 3 mm entre si, sendo um central e seis periféricos. Removeu-se o ágar por sucção através de uma bomba de vácuo. No poço central da placa foram adicionados 25µL do VLB-Lis e nos dois poços periféricos, superior e inferior, os soros dos animais imunizados a serem testados. A placa foi incubada em câmara úmida a 20-25°C por 48 horas (FIGURA 9). A leitura do teste foi feita utilizando-se a caixa de Hudleson para observação da ligação antígeno anticorpo por imunodifusão.

3.3 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS

Para a produção de anticorpos monoclonais foram utilizados os procedimentos preconizados por HARLOW & LANE (1988) e LLAMES *et al.* (2000), com modificações.

3.3.1 Cultivo de mieloma

As células de mieloma SP2-O/Ag14 foram gentilmente cedidas pela FIOCRUZ. Uma ampola foi previamente descongelada em garrafa 150 cm², cultivada em meio 8-Azaguanina (ANEXO 5) e mantida em estufa, por uma semana, sendo o meio trocado a cada 48 horas.

As células foram cultivadas por mais uma semana em meio de cultura RPMI (ANEXO 4) e contadas em câmara Fuchs Rosenthal.

3.3.2 Coleta de macrófagos intraperitoneal

Com 24 horas de antecedência da fusão, cinco camundongos foram sacrificados e submetidos à lavagem peritoneal com solução de sacarose esterilizada a 11,6% (ANEXO 10), para manter a isotonicidade das células.

Para coleta dos macrófagos os camundongos foram sacrificados em câmara de CO₂, após o sacrifício realizou-se assepsia com álcool 77° GL com o auxílio de gaze e a coleta foi realizada dentro do fluxo laminar. A pele do abdômen do camundongo foi aberta cuidadosamente para que não houvesse perfuração na membrana peritoneal. Em seguida foram inoculados 5 mL de solução de sacarose, massageado para a liberação dos macrófagos e aspirada a solução inoculada.

A suspensão de células foi centrifugada a 800g durante 15 minutos a 4°C, o sobrenadante desprezado, foi realizado contagem e o precipitado ressuspendido em 50 mL de meio de cultura RPMI. A suspensão de macrófagos foi distribuída na quantidade de 100µl/poço, em cinco placas de cultivo contendo 96 poços, e incubadas em estufa, durante 24 horas.

3.3.3 Coleta de linfócitos do baço dos animais imunizados

O baço de dois camundongos foi extraído por processo cirúrgico e colocados em placa de Petri com 5 mL de meio de cultura RPMI base (ANEXO 3). Com bisturis, realizou-se um corte longitudinal na cápsula esplênica liberando os esplenócitos no meio de cultura, os quais foram macerados, filtrados em peneira de nylon e centrifugados a 800g por 10 minutos. O precipitado foi ressuspendido e

adicionou-se sobre este 5 mL de tampão de lise (cloreto de amônio 0,16M pH 7,2; TRIS 0,17M pH 7,6) permanecendo em banho de gelo por 5 minutos. Para retirada do cloreto de amônio procedeu-se duas lavagem com 15 mL de meio de cultura RPMI base seguido de centrifugação como citado acima. O sobrenadante foi descartado, os linfócitos foram ressuspensos e realizou-se a contagem das células.

3.3.4 Fusão

Para fusionar as células utilizou-se a suspensão linfócito-mieloma que foi centrifugada a 800g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o tubo ficou vertido sobre papel de filtro por alguns segundos. Ao precipitado adicionou-se 1mL de polietilenoglicol/dimetilsulfóxido (Sigma Chemical Company) previamente aquecido a 37°C, gota a gota, sob agitação durante um minuto. Em seqüência foram adicionados: 2 mL de meio de cultivo RPMI base em dois minutos, 7 mL em dois minutos e finalmente outros 15 mL em dois minutos totalizando um volume final de 25 mL. A suspensão de células fusionadas foi centrifugada a 400g durante cinco minutos. O pellet foi ressuspensado com 25 mL de meio RPMI base e centrifugado novamente, para retirar possíveis resquícios de PEG/DMSO. Desprezou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspensado em 50 mL de RPMI.

A suspensão de células fusionadas foi distribuída (100 µL/poço) nas placas previamente preparadas com cultura de macrófagos, deixando duas fileiras de uma das placas reservadas para os mielomas. As placas permaneceram incubadas em estufa.

Após 48 horas pós-fusão foram substituídos 100µL de RPMI de cada poço por meio HAT. As placas foram observadas diariamente em microscópio invertido (Olympus 40x), substituindo-se 50% do meio de cultura até o 10º dia. A partir deste estágio as trocas de meio ocorreram a cada 48 horas conforme acidificação do meio e crescimento das colônias.

3.4 TRIAGEM DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS POR ELISA

3.4.1 Titulação VLB Lis x Conjugado anti- IgG camundongo

Com o objetivo de determinar concentrações ótimas dos reagentes utilizados no teste ELISA, foi analisado a titulação antígeno x conjugado e a diluição do soro.

3.4.1.1 Adsorção do Antígeno

Na elaboração do antígeno para o teste ELISA, utilizou-se o VLB-Lis. Foi escolhida a placa de polietileno com alta adsorção (Imunolon-Greiner), constituída de 96 poços com o fundo chato. Na primeira etapa da titulação foi adicionado 50µL/poço de tampão de adsorção (ANEXO 11) em toda a placa e depois adicionou-se 50µL/poço do antígeno 1:50 na coluna 1, que foi homogeneizado e transferido 50µL para a coluna seguinte e assim sucessivamente até a coluna 12 e os últimos 50µL foram desprezados, seguida de incubação 4 - 8°C durante a noite (16 horas).

3.4.1.2 Lavagem

A primeira lavagem teve como finalidade remover o excesso de antígeno que não se fixou na placa. Utilizou-se 300µL/poço de solução de lavagem (ANEXO 11), com o auxílio do aparelho para lavagem de placas (ELx50 Automated Strip Washer – Bio-Tek Instruments, INC). A operação de lavagem foi repetida por quatro vezes. A solução ainda restante nos orifícios da placa foi retirada, invertendo-se a placa sobre papel absorvente.

3.4.1.3 Bloqueio dos sítios de ligação inespecíficos

Esta etapa foi realizada com o objetivo de bloquear os sítios de ligação não específicos. O bloqueio da placa foi feito utilizando-se 200 µL/poço de solução de bloqueio (ANEXO 11). Incubou-se a mesma em estufa à 37 °C, por 60 minutos, em seguida verteu-se a placa para retirada do tampão e incubação do soro.

3.4.1.4 Incubação do Soro Positivo

Diluiu-se 1:100 em tampão de bloqueio o soro do camundongo imunizado com o antígeno VLB-Lis sabidamente positivo em imunodifusão conforme item 6.8. A diluição foi distribuída na proporção 50µL/poço e a placa incubada a 37°C durante 60 minutos. Após a incubação a placa foi lavada como descrito no item acima, para retirada dos anticorpos que não se ligaram ao antígeno adsorvido na placa.

3.4.1.5 Incubação do Conjugado

O segundo anticorpo a ser adicionado na placa foi a imunoglobulina anti-IgG de camundongo, conjugado com a enzima peroxidase (Sigma Chemical Company – A9044). De forma semelhante ao antígeno, foi feita a diluição seriada do conjugado, sendo distribuída no sentido A-H, partindo-se da diluição 1:800 em tampão de diluição do conjugado (ANEXO 11). A placa foi incubada a 37°C durante 60 minutos, seguida de lavagem.

3.4.1.6 Solução reveladora

A atividade enzimática foi revelada usando-se 50µL/poço da solução reveladora (ANEXO 11). A placa foi incubada a temperatura de 25°C, por 15 a 20 minutos.

3.4.1.7 Parada da Reação

Após 15 a 20 minutos de incubação a reação foi interrompida pela adição de 50 µL/poço de ácido sulfúrico 1M.

3.4.1.8 Leitura

Procedeu-se a leitura da densidade óptica (D.O) no leitor de micro placa (µ Quant - Bio-Tek Instruments, INC) utilizando-se um filtro com comprimento de onda de 492 nm. A leitura foi realizada nos 10 minutos seguintes à parada da reação para evitar o esmaecimento da coloração.

3.4.2 ELISA para seleção dos hibridomas positivos contra VLB

O procedimento utilizado foi o mesmo da titulação, com algumas modificações, no item (3.4.1), que ao invés de utilizar o soro positivo utilizou-se o sobrenadante dos hibridomas diluídos 1:2 em tampão de bloqueio e adicionou-se aos dois últimos poços da placa, soro positivo de camundongo imunizados com o vírus VLB lisado e soro negativo de camundongo do banco de soros do TECPAR diluídos 1:100. Para a diluição do antígeno e do conjugado foram escolhidos 1:1600 e 1:12800 respectivamente e plaqueados em todos os poços.

3.5 TESTE DE ESTABILIDADE DOS HIBRIDOMAS

Os hibridomas com reação positiva nas técnicas de triagem descritas acima foram submetidos a dois ciclos sucessivos de congelamento e descongelamento (-20°C/2h; -70°C/2h e Ni²) e crescimento para selecionar apenas clones estáveis. O meio de congelamento foi de 10% DMSO e 90% SFB.

3.6 CARACTERIZAÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS

3.6.1.1 Perfil eletroforético do VLB-Lis

Para visualização das proteínas estruturais e respectivos pesos moleculares do VLB, procedeu-se uma eletroforese em gel de poliacrilamida utilizando a cuba (Hoefer miniVE – Amersham Biosciences). As soluções utilizadas para o desenvolvimento da técnica estão dispostas no ANEXO 12.

3.6.1.2 Preparo do Gel SDS-PAGE

Para montagem do sistema eletroforético utilizou-se duas placas de vidro (10x10.5cm) que foram lavadas e deixadas submersas em solução de álcool, durante alguns minutos, a fim de remover todo o tipo de sujidades e gordura. Após enxugadas, o conjunto de placas foi montado, entre elas foram fixados os espaçadores de 1,0 mm de espessura com o auxílio de uma cola (GelSeal –

Amersham). O conjunto foi preso no suporte de montagem e nivelado com água para verificação de vazamentos.

Foram preparados dois géis: o de separação e o de concentração, a diferença entre ambos é a concentração de acrilamida e bisacrilamida e o pH de tampão utilizado nos dois géis. O gel de separação utilizado a 15% foi aplicado nas placas e acrescido 1 mL de água ultra-pura para nivelamento do gel, que após sua polimerização foi descartado. O gel de empilhamento a 5% foi aplicado no conjunto de placas em cima do gel de separação e em seguida colocado o pente de amostra. Após a polimerização, o pente e o suporte de montagem foram removidos e o conjunto fixado no suporte de corrida, sendo estes preenchidos com tampão de corrida (ANEXO 12).

3.6.1.3 Preparo e aplicação do VLB- Lis e do marcador de peso molecular

Utilizamos 150 µg do VLB-Lis e adicionou-se solução desnaturante mercapto-etanol, na proporção de 1:1, em seguida fervida em banho-maria, durante cinco minutos. Esta amostra e o padrão foram aplicados cuidadosamente no fundo de cada poço do gel, obedecendo-se rigorosamente o mesmo volume de 25 e 2µL/poço respectivamente.

3.6.1.4 Corrida eletroforética

A fonte utilizada foi ligada e conectada aos eletrodos da cuba estabelecendo corrente elétrica entre os pólos negativo e positivo. A amperagem constante foi estabelecida em 20 mA. O tempo de corrida foi aproximadamente de 5 horas, e determinado pela chegada do corante indicador (azul de bromo fenol) ao final do gel.

3.6.1.5 Revelação do gel

Ao término da eletroforese o gel foi imerso durante 2 horas sob leve agitação em solução Coomassie Azul Brilhante, seguido de aproximadamente quatro lavagens com solução descorante até completa descoloração do gel. O peso molecular de cada

polipeptídeo foi determinado pela construção de reta padrão obtida em função do peso molecular e da mobilidade eletroforética das proteínas do padrão.

3.6.2 Imunoeletrotransferência (*Western Blotting*)

Para análise da presença de frações protéicas dos hibridomas foram utilizados ensaios de imunodeteção, realizado por eletroforese do VLB-Lis. As proteínas virais foram transferidas para membranas de PVDF.

3.6.2.1 Montagem da Cuba para a Transferência (WB)

Ao término da eletroforese o gel foi removido e colocado em recipiente plástico com tampão de transferência, sendo uma das extremidades do gel identificada. A membrana de PVDF foi cortada no mesmo tamanho que o gel e mergulhada, durante 15 segundos, em metanol 100%, seguido de 15 segundos em tampão de transferência para equilíbrio da mesma. A montagem do conjunto de placas foi disposto: folha de espuma, papel filtro, gel, membrana PVDF, papel filtro e duas folhas de espuma. Este conjunto foi então fechado em forma de “sanduíche”, uma vez que o gel ficou voltado para o pólo negativo da cuba e a membrana de PVDF para pólo positivo. Dentro do suporte que acondicionava o conjunto foi adicionado tampão de transferência até completa submersão.

3.6.2.2 Transferência (WB)

O suporte contendo o “sanduíche” foi acondicionado em cuba de transferência (Amersham), que foi totalmente preenchida com água purificada 15°C. A transferência ocorreu sob refrigeração 4 °C, com voltagem constante de 25 volts, por um período de 16 horas.

3.6.2.3 Preparo da Membrana

Após a coloração, a membrana foi seca em papel filtro e tiras, correspondentes as linhas da corrida no gel de poliacrilamida, foram cortadas e

identificadas. Estas tiras de PVDF foram submetidas a imunodeteccção, que é um procedimento semelhante ao de um ELISA indireto.

3.6.2.4 Lavagem

As tiras foram colocadas em canaletas separadas e identificadas, foram adicionados 3 mL/canaleta de água destilada, e deixadas sob agitação contínua, por 3 minutos, para lavagem de possíveis resíduos de gel.

3.6.2.5 Bloqueio

Foram adicionados 3 mL/canaleta de tampão de bloqueio, para bloquear os sítios de ligação não específicos e incubada por 60 minutos a temperatura de 25°C, sob agitação constante.

3.6.2.6 Incubação do sobrenadante dos hibridomas

O sobrenadante de cada hibridoma foi diluído 1:1 em Tampão de Bloqueio. Cada tira foi incubada com 1 mL/canaleta da solução, sob agitação contínua, durante 60 min á 37 °C e posterior lavagem para remoção de anticorpos que não se ligaram aos antígenos fixados na membrana de PVDF.

3.6.2.7 Incubação do Conjugado

O conjugado Anti-IgG camundongo (Sigma Chemical Company – A9044), foi diluído 1:2000 em solução de bloqueio e sob as tiras foram adicionados 1 mL/canaleta, seguido de incubação à 37 °C , lenta agitação contínua durante 60 min e lavagem.

3.6.2.8 Solução reveladora

Para enzima peroxidase o substrato utilizado foi 4-Cloro -1-Naftol. Adicionou-se 1 mL/canaleta da solução reveladora, durante 20 min, sob agitação, a reação foi bloqueada com água ultra-pura.

3.6.3 Isotipagem

Para definição dos isotipos dos anticorpos, foi utilizada a técnica ELISA, o Kit (Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents – Sigma) e as soluções do ANEXO 11.

3.6.3.1 Diluição do anticorpo

Foi utilizada uma diluição de 1µl/mL de cada amostra (sobrenadante do cultivo dos hibridomas ascítico) diluída em PBS. A partir desta diluição utilizou-se 100 µL/poço para cada isotipo, sendo distribuídos na placa de A-F, a placa foi incubada 1 hora a 37°C, seguido de lavagem como descrito no item (3.6.2.4), mas com a utilização de três ciclos.

3.6.3.2 Diluição dos isotipos

Os seis isotipos do Kit foram diluídos 1:1000 e distribuído 100 µL/poço na placa de 1-10, a placa permaneceu 30 minutos a 20-25 °C. Após incubação procedeu-se a lavagem.

3.6.3.3 Diluição do conjugado

O conjugado anti-IgG Camundongo foi diluído 1:5000 em tampão de lavagem, e distribuído 100 µL/ poço, a placa permaneceu 15 minutos a 20-25°C, seguido de lavagem.

3.6.3.4 Solução reveladora

A solução reveladora utilizada foi distribuída 100 µL/poço e deixada em câmara escura por 20 minutos até coloração dos isotipos referentes

3.7 PRODUÇÃO DE LÍQUIDO ASCÍTICO E HIBRIDOMA ASCÍTICO.

Para produção do líquido ascítico e dos hibridomas ascítico (HARLOW & LANE 1998) foi injetado em, 10 fêmeas BALB/c, 500 μ L de Pristane (Sigma), via intraperitoneal. Dez dias após a aplicação injetou-se cada um dos hibridomas em um camundongo, também por via intraperitoneal na concentração de 10^6 células suspensas em 200 μ L de meio RPMI. Quinze dias após esta injeção coletou-se aproximadamente 9 mL de cada camundongo, sacrificando-os em seguida. O líquido ascítico foi centrifugado 3000g durante 10 minutos, o sobrenadante estocado a -20°C , para teste.

O sedimento contendo hibridoma foi: ressuspendido, colocado em banho de gelo, adicionado 5 mL de tampão de lise de hemácia, durante 5 minutos e centrifugado. Descartou-se o sobrenadante e sobre o sedimento ressuspendido adicionou-se 12 mL de meio RPMI que foi distribuído 500 μ L/poço em uma placa contendo 24 poços.

Após os hibridomas preencherem 80% dos poços, foram homogeneizados levemente com micropipeta, para desprendimento apenas dos hibridomas, uma alíquota de 20 μ L foi coletada e colocada em garrafa 25 cm^2 para crescimento, expansão e congelamento.

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos na produção do antígeno foram de 2000 mL de sobrenadante de células FLK-BLV. No protocolo utilizou-se 40% de meio a menos, quando comparado com o protocolo padrão de produção. A determinação protéica do sobrenadante foi de 13,11 mg/mL.

A partir da determinação protéica o antígeno obtido foi lisado e o esquema de imunização via intra-peritonial resultou uma excelente resposta humoral, contra o vírus da LB, em camundongos BALB/c. A imunidade foi verificada por imunodifusão em ágar gel, na qual obteve-se duas diferentes respostas, na 2º e 5º imunização. Para o vírus *in natura* a linha de precipitação (complexo antígeno-anticorpo) apresentou-se nítida e com um forte contorno e para o antígeno lisado ocorreu a formação de duas linhas de precipitação, mais fraca, respectivamente (FIGURA 9).

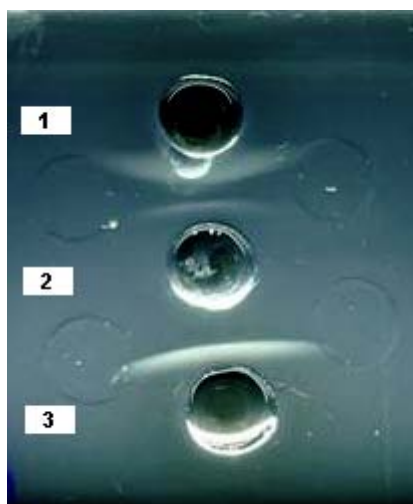


FIGURA 9 – TESTE DE IMUNODIFUSÃO EM ÁGAR PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-VLB. 1) SORO HIPERIMUNE 5º IMUNIZAÇÃO; 2) VÍRUS VLB - LISADO; 3) SORO HIPERIMUNE 2º IMUNIZAÇÃO.

Na fusão realizada utilizou-se 5 placas de cultivo de 96 poços, sendo $9,6 \times 10^5$ macrófagos distribuídos em 480 poços, dia (0) (FIGURA 10) e as células fusionadas, $18,2 \times 10^6$ mieloma / $91,12 \times 10^6$ linfócitos, dia (1) obedecendo a proporção de 1:5 respectivamente, distribuídas em 456 poços para crescimento de hibridomas. Nos outros 24 poços foram adicionados 4×10^3 mielomas, a fim de servir como controle

de mortalidade destes em meio HAT. Após o sétimo dia já foi possível verificar a morte de 100% dos mielomas e decorridos dez dias da fusão, foram observadas as primeiras colônias de hibridomas (FIGURA 11).

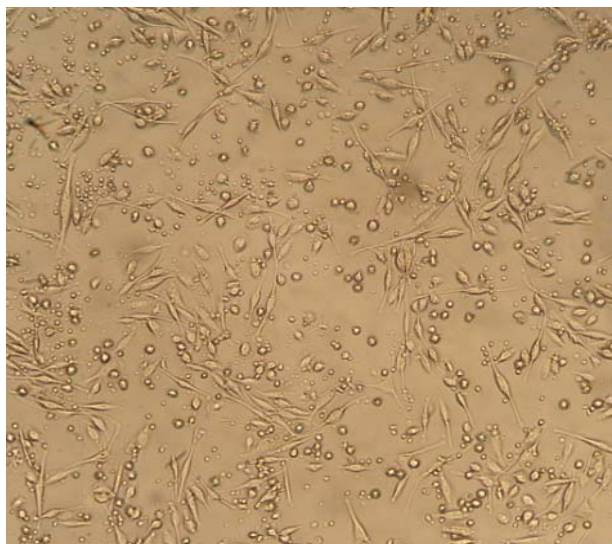


FIGURA 10 – CÉLULAS DE MACRÓFAGOS PERITONIAIS DE CAMUNDONDO, PRÉ-FUSÃO, ADERIDAS NO POÇO DA PLACA DE CULTIVO.

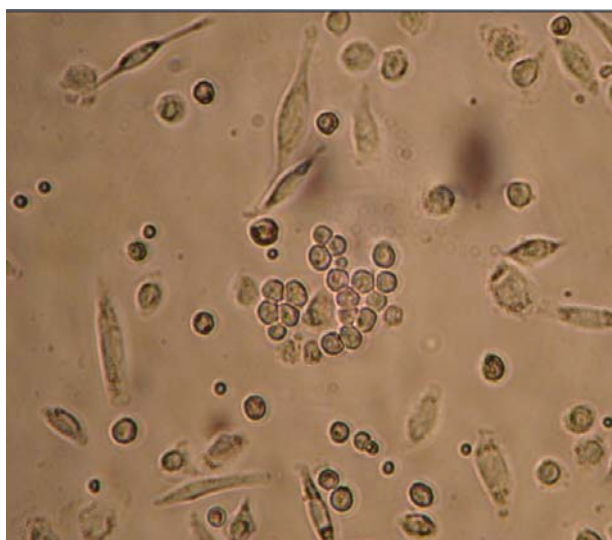


FIGURA 11 – FORMAÇÃO DA COLÔNIA DE HIBRIDOMA APÓS DEZ DIAS DE FUSÃO.

O sobrenadante dos hibridomas foi coletado quando 80% do poço apresentava-se com crescimento e com 48 horas sem troca de meio. Foram obtidos 274 poços com colônias de hibridomas, sendo estes testados sete vezes por ELISA indireto, em diferentes fases de crescimento e de ampliações. Foram considerados 18 hibridomas positivos, com leitura a 492 nm superior ao controle negativo e

coloração visível a olho nu e nove hibridomas fraco positivo com leituras baixas e sem coloração visível, que foram eliminados.

Os 18 hibridomas positivos foram selecionados, expandidos e submetidos a dois ciclos de congelamento e descongelamento, foram mantidos em cultivo e novamente testados por ELISA indireto. Dos 18 hibridomas positivos, 10 permaneceram sem alteração no teste imunoenzimático, três tiveram sua capacidade de secreção de anticorpos reduzida em aproximadamente 40% e cinco perderam completamente a capacidade de secreção de anticorpos, tornando-se negativos no teste.

Para caracterização dos AcMc, o gel de corrida eletroforética do vírus (FIGURA 12) foi transferido para membrana de PVDF em seguida foi realizado o ensaio de *Western Blotting*, para determinar contra quais proteínas os anticorpos secretados pelos hibridomas responderiam. Após revelação da membrana com cromógeno foi possível detectar uma proteína de peso molecular de 51 kDa produzida por todos os clones (FIGURA 13).

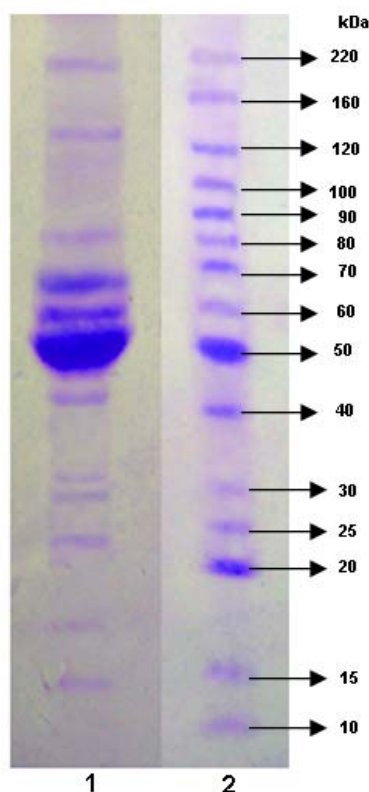


FIGURA 12 – GEL SDS-PAGE A 12,5%. 1) VLB-LISADO; 2) MARCADOR DE PESO MOLECULAR (BENCHMARK 220-10kDa).

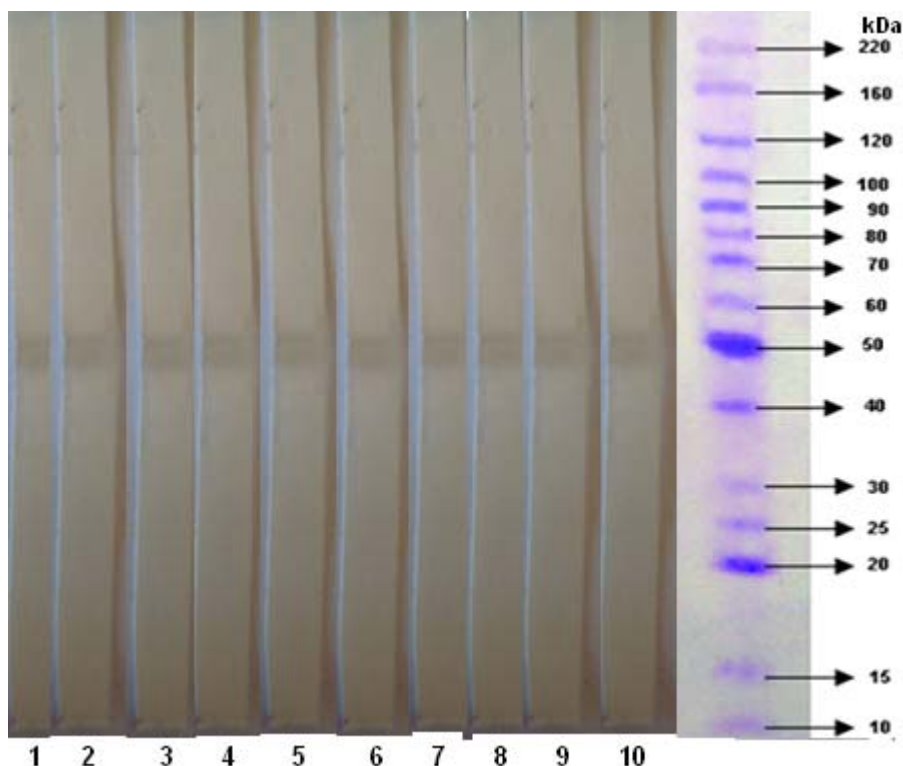


FIGURA 13 – CONFIRMAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-gp51 PELA TÉCNICA DE *WESTERN BLOTTING*. 1) CLONE B3; 2) CLONE C2; 3) CLONE D4; 4) CLONE E3; 5) CLONE E4; 6) CLONE E10; 7) CLONE F1; 8) CLONE F5; 9) CLONE F11; 10) CLONE G8; 11) MARCADOR DE PESO MOLECULAR (BENCHMARK 220-10kDa).

A determinação da caracterização dos isotipos foi realizada pelo kit de isotipagem (Sigma), foram observados clones produtores anti-gp51 correspondentes a classes IgM (9 AcMc) e IgG (1 AcMc) subclasse IgG1 (FIGURA 14 e TABELA 4).

Foram selecionados e submetidos a produção de AcMc ascítico apenas os dez hibridomas que apresentaram estabilidade. O cultivo dos hibridomas retirados do líquido ascítico apresentaram superioridade de morfologia, ausência de debris celulares e melhor performance de crescimento (FIGURA 15).

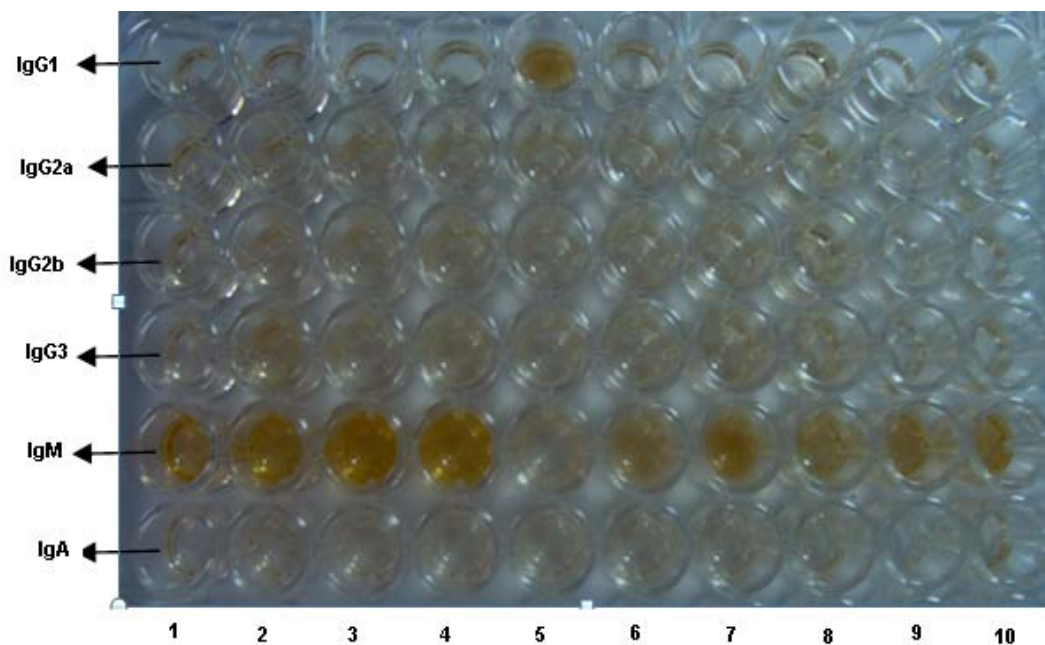


FIGURA 14 – ISOTIPAGEM DOS MONOCLONAIS PRODUZIDOS CONTRA O VÍRUS VLB-LISADO.
1) CLONE B3; 2) CLONE C2; 3) CLONE D4; 4) CLONE E3; 5) CLONE E4; 6) CLONE E10; 7) CLONE F1; 8) CLONE F5; 9) CLONE F11; 10) CLONE G8.

TABELA 4 – ESPECIFICIDADE; CLASSES E SUBCLASSES DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS PRODUZIDOS CONTRA O VLB-LISADO.

Hibridomas	ISOTIPOS					
	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgM	IgA
B3	-	-	-	-	X	-
C2	-	-	-	-	X	-
D4	-	-	-	-	X	-
E3	-	-	-	-	X	-
E4	X	-	-	-	-	-
E10	-	-	-	-	X	-
F1	-	-	-	-	X	-
F5	-	-	-	-	X	-
F11	-	-	-	-	X	-
G8	-	-	-	-	X	-
Total	1	0	0	0	9	0

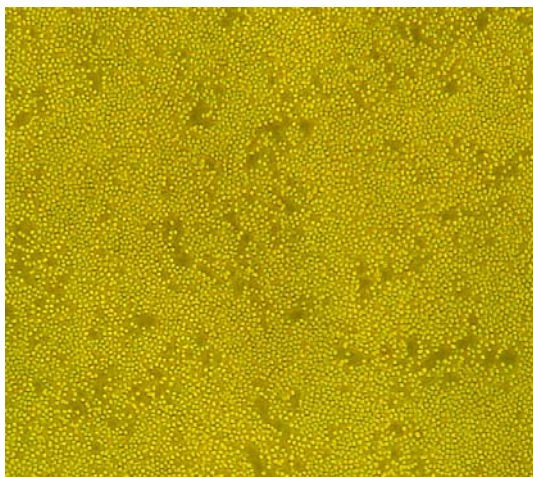


FIGURA 15 – AcMc ASCÍTICO CONTRA A PROTEÍNA gp51 DO VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA.

Os sobrenadantes dos hibridoma e dos ascítico foram testado em ELISA e realizou-se a determinação protéica (D.P), este procedimento ocorreu sobre mesma condição de crescimento.

Todos os hibridomas provenientes do líquido ascítico apresentaram um aumento na secreção de anticorpos anti gp51, quando comparados aos seus respectivos hibridomas, derivados diretamente da fusão. Os clones ascítico D4, E4, e F11 apresentaram aumento de aproximadamente 5 vezes na densidade ótica (D.O) e 2 vezes (D.P), enquanto o clone F1 teve um aumento de 3 vezes (D.O) e 1,5 vezes (D.P).

Para a produção em maior escala de AcMc anti gp51 do vírus da leucose bovina foram eleitos 4 hibridomas, D4Asct, E4Asct, F11Asct e F1Asct, em ordem decrescente, que apresentaram maior densidade ótica e concentração de proteínas.

O resultado do ensaio imunoenzimático é apresentado no GRÁFICO 1. Tendo o eixo X representado pela leitura da absorbância 492 nm e o eixo Y pelos hibridomas e hibridomas ascítico obtidos.

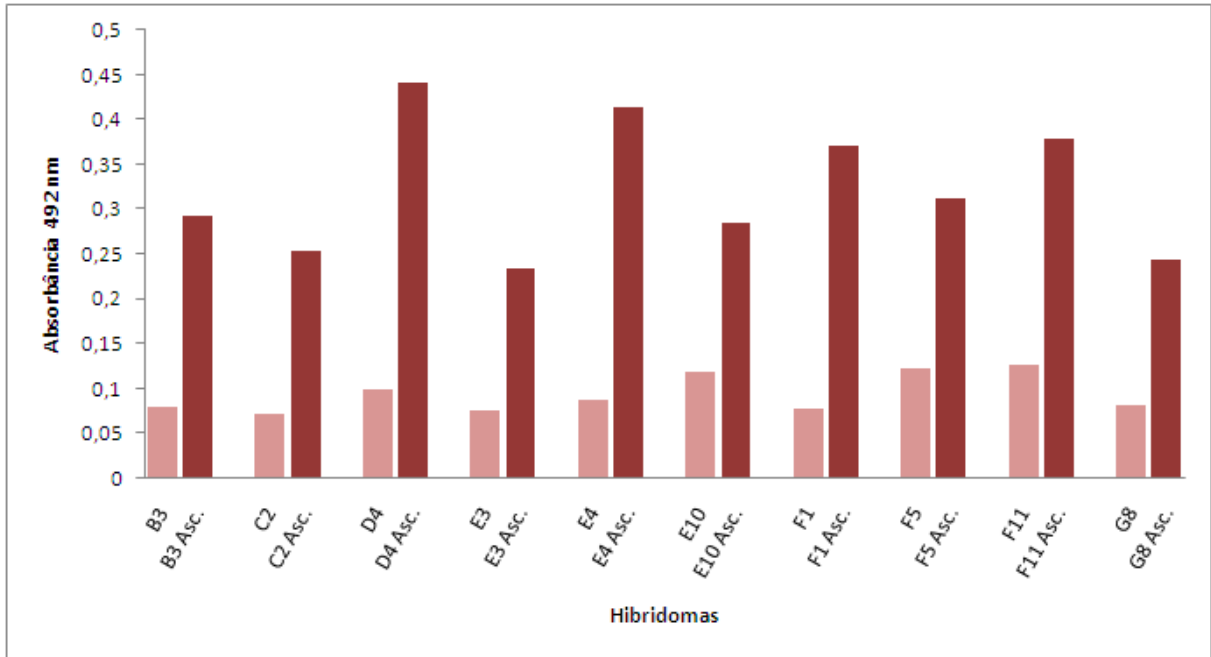


GRÁFICO 1 – REPRESENTAÇÃO DA ABSORBÂNCIA ENTRE HIBRIDOMAS E HIBRIDOMAS ASCÍTICO.

O GRÁFICO 2 apresenta os resultados da determinação protéica. Tendo o eixo X representado pelo cálculo da leitura da absorbância 260 nm /280 nm e o eixo Y pelos hibridomas e hibridomas ascítico obtidos.

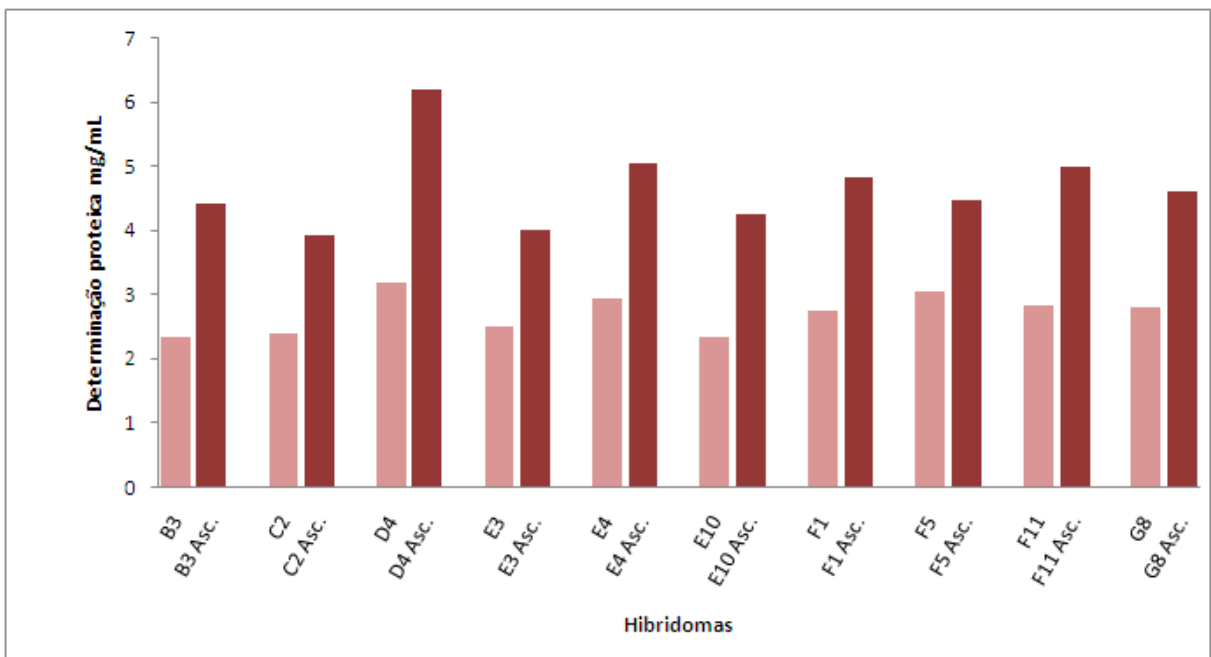


GRÁFICO 2 – REPRESENTAÇÃO DA DETERMINAÇÃO PROTÉICA ENTRE HIBRIDOMAS E HIBRIDOMAS ASCÍTICO.

5 DISCUSSÃO

Na fase de produção do antígeno foi selecionado o protocolo padrão, habitualmente utilizado na produção de antígeno VLB do TECPAR, com uma alteração na quantidade do meio utilizado em cada passagem. Sendo definido a quantidade de meio de 25 mL em garrafas 150 cm² ao invés de 40 mL. Esta quantidade foi suficiente para, cobrir toda superfície da garrafa, não ocorreu acidificação prejudicial às células e manteve-se o período de preenchimento da monocamada de 48 horas, tempo estipulado de coleta. Este método apresentou melhor resultado com uma concentração de 13,11 mg/mL, aproximadamente 4,10 mg/mL (32%) a mais que o protocolo padrão.

Um ponto importante na produção de monoclonais pela técnica de fusão celular é a escolha do imunógeno. Foi descrito na literatura que para a produção de AcMc, é possível utilizar peptídeos, proteínas purificadas, parcialmente purificadas ou ainda amostras de tecidos não purificadas, com características solúveis ou insolúveis (STAHL *et al.*, 1983; CIANFRIGLIA *et al.*, 1987).

A seleção da preparação do antígeno foi baseada em dois critérios principais, visto que a primeira consideração é que as proteínas do VLB são diferentes e possuem diferentes conformações. A imunização com o vírus *in natura*, foi utilizada esperando a obtenção de AcMc reagindo contra a partícula viral inteira e na imunização com o vírus lisado a identificação de AcMc conta proteínas virais intracelulares. O segundo critério utilizado foi a purificação do vírus direcionando a resposta dos anticorpos apenas para proteínas virais, evitando respostas inespecíficas para as proteínas celulares, conforme protocolo descrito por LLAMES *et al.* (2000).

O antígeno obtido *in natura* foi utilizado na imunização (dia 0) junto com adjuvante de *Freund* completo contendo *Mycobacterium tuberculosis* inativa a fim de estimular o sistema imune do animal. Geralmente os anticorpos produzidos logo após esta aplicação possuem alta concentração e inespecificidade. Nas inoculações seguintes o adjuvante foi substituído por adjuvante incompleto de *Freund* (sem presença da *M. tuberculosis*) para aumento da especificidade do anticorpo. A

imunização (dia 15) foi utilizada com o antígeno *in natura* sendo substituída (dia 30, 45 e 60) pelo vírus lisado. A lise realizada com solução hipotônica contendo detergente não-iônico promoveu exposição e liberação das proteínas do capsídeo e núcleo viral. No entanto, no presente trabalho a utilização de antígenos purificados e lisado resultou em apenas anticorpos contra uma proteína.

A imunização intraperitoneal foi escolhida por não lançar diretamente o antígeno no sistema sanguíneo, uma vez que lançado diretamente na corrente sangüínea junto com um tampão de lise se torna uma substância tóxica ao animal podendo ser letal (LLAMES *et al.*, 2000).

O método de imunodifusão permitiu a detecção do anticorpo, presente no soro, do animal imunizado. Durante a incubação ocorreu difusão do anticorpo e do antígeno na agarose e formação de complexos antígeno-anticorpo insolúveis que precipitam e formam linhas entre os orifícios. Uma linha de precipitação nítida e bem definida foi visualizada após a segunda imunização com o antígeno *in natura*. A quinta imunização utilizando antígeno lisado foi testada e apresentou formação de duas linhas, uma forte e outra um pouco menos intensa. A formação de uma linha de precipitação indicou a presença de anticorpos específicos para proteína gp51, visto que a formação de duas linhas indicou dois imunocomplexos, um para a proteína gp51 e outro para proteína p24.

O desenvolvimento de técnica de produção de anticorpos monoclonais em cultura de células aumenta rapidamente a produção de anticorpos específicos e homogêneos contra um epítipo específico de escolha. Esta técnica se resume na fusão de células secretoras, incapazes de crescimento *in vitro* (Linfócitos B) e células tumorais (mieloma), com capacidade de imortalidade em cultivo. Vários fatores são associados com o rendimento do processo de produção de monoclonais, entre eles: a escolha do protocolo, temperatura, agente fusogênico, proporção de células, tampões, meios e condições de cultivo (LAMBERT *et al.*, 1997). O princípio da técnica de produção de AcMc não sofreu alteração desde 1976, atualmente os artigos publicados descrevem apenas adaptações e algumas modificações (LLAMES *et al.* 2000).

No presente trabalho as condições de produção dos AcMc foram realizadas com algumas adaptações no protocolo descrito por HARLOW & LANE (1988) e LLAMES *et al.* (2000).

Segundo GODING (1980), quanto maior a distância filogenética dos animais doadores de baço (linfócito B) e de célula de mieloma, mais instáveis serão os híbridos resultantes da fusão. Deste modo a linhagem Sp2/0-Ag14 e linfócitos B derivados de camundongos de mesma linhagem (BALB/c), foram escolhidos. O cultivo inicial dos mielomas com 8-Azaguanina durante sete dias foi utilizado para seleção de células que são realmente hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase negativas (-HGPRT).

Entre os fatores de decisão para o planejamento do experimento utilizou-se macrófagos peritoneais em co-cultura, como fator de crescimento para os AcMc. Estas células liberam citocinas (IL1, IL6 e IL8), promovendo proliferação dos hibridomas e fagocitose de *debris* celulares liberados pelos mesmos (HARLOW & LANE, 1988; LLAMES *et al.*, 2000; ABDEL-GHANY *et al.*, 2009).

O tempo preciso de retirada do baço, após a última imunização, também tem sido associado como fator determinante no resultado da fusão e produção de anticorpos (STHAL *et al.*, 1983; CIANFRIGLIA *et al.*, 1987). Os linfócitos provenientes do baço sofreram lise de hemácias para aumentar as chances de colisão entre os linfócitos B e as células de mieloma (HURRELL, 1988). Outro fator de grande influência no sucesso da fusão é a proporção de mieloma/linfócito (HARLOW & LANE, 1988), a escolha de 1 mieloma para 5 linfócitos diminui a fusão de mielomas entre si, aumentando apenas a probabilidade de fusão linfócito/mieloma (ORLIK *et al.*, 1993). Ainda não existe um protocolo padrão ou que referencie uma proporção perfeita de células para a fusão, tornando os protocolos empíricos. A proporção escolhida de células neste trabalho obteve um bom resultado, 60% dos 456 poços apresentaram colônias de hibridomas.

A frequência de fusão é definida pelo número de hibridomas gerados dividido pelo número de linfócitos utilizados na fusão (aproximadamente 1×10^8 células totais de um único baço).

Foi optado por realizar o processo de fusão pela adição de PEG/DMSO. Este método tem um rendimento de frequência de fusão em torno de 3×10^5 – 6×10^6

células hibridizadas (LANE *et al.*, 1984; LANE *et al.* 1986). No momento da adição do PEG/DMSO sobre as células e posteriores manipulações, foi importante manter sempre a temperatura de 37 °C, visto que a desestabilização da membrana e a fusão celular são mais eficientes nesta temperatura. O tempo de exposição das células ao PEG/DMSO foi determinado em um minuto, como este é tóxico para as células pode diminuir o número de células fundidas.

Constatou-se a presença de 274 poços com colônias de hibridomas e por ensaio imunoenzimático indireto foram identificados: 18 hibridomas positivos com coloração visível (absorbância acima de 80 nm) e 9 hibridomas fraco positivos com densidade ótica abaixo de 50 nm, sem coloração visível, que foram eliminados.

A presença de colônias não secretoras pode ser explicada, quando os dois tipos celulares são fundidos (linfócito B e mieloma), na mitose ou interfase, o DNA sofre segregação para as células filhas, formando assim diversos híbridos ou clones. Durante a segregação o número de cromossomos é maior que o normal, nem sempre a divisão é igual para as células filhas e muitos cromossomos podem ser perdidos. A perda de cromossomos pode resultar na incapacidade dos hibridomas em produzir anticorpos específicos ou de fazer rearranjos das frações variáveis das cadeias leves e pesadas (HARLOW & LANE, 1988). Cerca de 50% dos hibridomas gerados que inicialmente expressam anticorpos contra um antígeno desejado perdem a habilidade de expressão devido à perda cromossomal (CLARCK *et al.*, 1981). Contudo quando a fusão das células é bem sucedida suas propriedades essenciais são mantidas: crescimento em cultivo de células e secreção de anticorpos com especificidade pré-definida (KOHLE, 1981; SASAKI, 1990).

Para os AcMc do VLB obtidos serem utilizados como insumo diagnóstico, a estabilidade dos clones foi testada. O teste permitiu selecionar 10 hibridomas, dos 18 iniciais, que não perderam sua capacidade de secreção de anticorpos. Este dado está de acordo com os resultados observados por CLARCK (1981), onde vários clones submetidos a dois ciclos sucessivos de congelamento e descongelamento perderam a capacidade de expressão de AcMc.

O congelamento e descongelamento foi utilizado com sucesso para seleção e determinação dos AcMc viáveis e estáveis para produção de anticorpos (PRAVTCHEVA *et al.*, 1983). Entretanto, não existem trabalhos na literatura que

especifiquem a quantidade de ciclos de congelamento e descongelamento necessários para assegurar a estabilidade dos hibridomas. A perda da capacidade de secreção de alguns clones pode ser concluída devido a segregação e a reorganização dos cromossomos que produzem nas células híbridas uma considerável variabilidade nas propriedades de crescimento e instabilidade. Estudos mostram a estabilidade destes clones cerca de 20 a 25 dias após a fusão (NOWINSKI et al., 1983; NELSON, 2000).

Quanto a caracterização dos AcMc produzidos podemos salientar que a gp51 é a molécula mais imunogênica do VLB e o isotipo IgM é o mais prevalente dentre os outros seis isotipos testados, desta forma a obtenção de clones direcionados apenas contra gp51 é justificada (LLAMES *et al.*, 2000).

A inoculação intraperitoneal dos hibridomas para produção de AcMc ascítico mostrou aumento de absorbância, no ensaio imunoenzimático, dos clones ascítico D4, E4, F11 e F1 em aproximadamente cinco vezes e aumento da concentração protéica de duas vezes em relação aos hibridomas produzidos inicialmente. Esses apresentaram superioridade de morfologia, ausência de debris celulares e melhora do desempenho de crescimento. Tal resultado é justificado por HARLOW & LANE (1988), para obter uma maior produção de anticorpos monoclonais, os hibridomas podem ser inoculados na cavidade peritoneal de camundongo, este processo causa um processo inflamatório, aumentando o fluxo de macrófagos e acelerando a produção e concentração destes no líquido ascítico e no sobrenadante do cultivo de célula pós ascite (1 a 10 mg/mL). Uma vez que o cultivo realizado em garrafas é até 1000 vezes menor.

O diagnóstico da LEB para rebanhos brasileiros é feito por métodos baseados na detecção de anticorpos para a proteína gp51, sendo a imunodifusão em gel de ágar ainda considerada o exame padrão mais utilizado, devido sua especificidade, aceitável sensibilidade e baixo custo comparado com kit ELISA importados e outras técnicas disponíveis. Essa metodologia utiliza cultivo de células FLK-BLV para produção do antígeno, procedimento dispendioso de tempo e custo, além de não ser prática para teste em um grande número de amostras.

A fim de melhoria do diagnóstico em saúde animal e complementação na produção de insumos do Instituto de Tecnologia do Paraná, a produção dos AcMc foi

realizada visando extensão de trabalho com a preparação de um kit ELISA diagnóstico para detecção da LEB, em amostras de soro e leite bovino. A incorporação desta tecnologia promove a melhoria de resultados, promove kits com custos mais baixos de simples metodologia e praticidade de realização em grande número de amostras além de torná-los mais acessíveis a produtores promovendo maior controle da infecção no país.

6 CONCLUSÃO

- 1) A metodologia empregada para produção do antígeno (VLB) apresentou bons resultados, a concentração de proteína aumentou em 32% e reduziu o volume de meio utilizado na produção em 40%.
- 2) A escolha do imunógeno purificado, *in natura* e lisado, eliminou respostas inespecíficas para proteínas celulares e resultou nos camundongos uma resposta humoral para as duas proteínas mais imunógenas do VLB, gp51 e p24.
- 3) A fusão entre mielomas e linfócitos B de camundongos imunizados, apresentou crescimento de 274 colônias de hibridomas. Destas colônias o teste imunoenzimático, identificou 27 anticorpos monoclonais positivos para proteínas do VLB. Foram selecionadas para produção em maior escala as 10 colônias que apresentaram melhor resultado de estabilidade e secreção de AcMc.
- 4) Os AcMc ascítico produziram maior quantidade de anticorpos, uma vez que apresentaram maior concentração protéica e maior densidade ótica nos testes ELISA indireto realizados, quando comparados aos AcMc que não foram submetidos ao líquido ascítico.
- 5) A obtenção de hibridomas 100% reagentes contra a proteína gp51 garante a utilização deste AcMc como insumo no diagnóstico da LEB.
- 6) Portanto, o presente trabalho atingiu o seu objetivo geral que era produção de anticorpos monoclonais, anti-gp51 do vírus VLB.
- 7) A perspectiva deste trabalho, visa a utilização destes AcMc para a purificação do antígeno VLB e sua utilização no diagnóstico da leucose bovina, através de ELISA com alta especificidade, homogeneidade e reprodutibilidade. Promovendo desta forma a auto-suficiência do Brasil no diagnóstico da LEB. Além de auxiliar o Ministério da agricultura em programas de controle e erradicação.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**, 6º ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- ABDEL-GHANY, I.Y.; EL-BAYOUMY, A.S.; ELMOUHTY, N.R.A.; SHAFIK, H.M. Production and evaluation of monoclonal antibodies for alphafetoprotein. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 280, n.3, p. 651–655, 2009.
- ABRAMOVA, E.N.; KONDRATEV, V.S.; SYTINSKII, I.A. The biochemistry of leucosis in cattle. **The Veterinary Bulletin**, v.44, p.689-711, 1974.
- ABREU, V.L.V.; SILVA, J.A.; MODENA, C.M. Prevalência da leucose enzoótica bovina nos estados de Rondônia e Acre. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnologia**, v. 42, n. 3, p. 203-210, 1990.
- AIDA, Y.; MIYASAKA, M.; OKADA, K.; ONUMA, M.; KOGURE, S.; SUZUKY, M.; MINOPRIO, P.; LEVY, D.; IKAWA, Y. Further phenotypic characterization of target cells for bovine leukemia virus experimental infection in sheep. **American Journal Veterinary Research**, v.50, p.1946-1951, 1989.
- ALENCAR FILHO, R.A.; MAZANTI, M.T.; SAAD, A.D.; POHL, R. Levantamento preliminar da infecção pelo vírus da Leucemia Linfática Crônica (L.L.C.) dos bovinos no estado de São Paulo. **O Biológico**, v.44, n.3/4, p.47-54, 1979.
- ALFONSO, R.; ALMANSA, J.E.; BARREIRA. Sorological prevalence and evolution of the risk factors of bovine leukosis in the Bogotá savannah and the Ubate and Chiquinquirá Vatlays, Colômbia. **Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties**, v.17, n.3, p.723-732, 1998.
- ALTANER, C.; BAN, J.; ZAJAC, V.; ROESSLER, H.; ROSENTHAL, S.; KETTMANN, R.; BURNY, A. Isolation and characterization of cell clones producing various amounts of bovine leukemia virus. **Folia Biology**, v.31, p.107-114, 1985.
- ALTANEROVA, V.; PORTETELLE, D.; KETTMANN, R.; ALTANER, C. Infection of rats with bovine leukemia virus: establishment of a virus-producing rat cell line. **Journal of General Virology**, v.70, p.1929-1932, 1989.
- ANDRADE, J.R.A.; ALMEIDA, M.M.R. Prevalência da leucose enzoótica bovina na bacia leiteira de Goiânia, Goiás. **Hora Veterinária**, v.10, p.49-53, 1991.
- BAN, J.; GIECIOVA, E.; ORLIK, O.; ALTANER, C. Use of monoclonal antibodies in an ELISA for the diagnosis of bovine keukaemia virus infection. **Journal of virological methods**, v.30, n.1, p.79-87, 1990.

BARROS, C.S.L.; FLORES, E.F. Leucosis bovina. In: XVII JORNADAS URUGUAYAS DE BUIATRIA, 1974, Paysandú, R.O.U. **Anais**, p.01-20.

BARROS, C.S.L. Leucose Bovina In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; MENDEZ, M. LEMOS, R.A.A. **Doenças de ruminantes e equinos**. 3. ed. Santa Maria: Pallotti, 2007. v.1, n.2, p.159-168.

BARSKI, G.; SORIEUL, S; CORNEFERT, F. Production dans des cultures in vitro de deux souches cellulaires en association, de cellules de caractère hybride. **Comptes Rendus de l'Académie des sciences**, v.251, p.1825-1827, 1960.

BIRGEL, E.H. Leucose Enzoótica dos bovinos adultos: aspectos clínicos e diagnóstico. In: BIRGEL, E.H.; BENESI, F.J. **Patologia Clínica Veterinária**, 2 ed. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982. p.249-260.

BIRGE JUNOR, E.H.; D'ANGELINO, J.; BENESI, F.J.; BIRGEL, E.H. Prevalência da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos, em animais da raça Jersey, criados no Estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.15, n.4, p.93-99, 1995.

BIRTLES, R.J.; HARRINSON, T.G.; SAMUEE, D.; TAYLOR, A.G. Evaluation of urinary antigen ELISA for diagnosis Legionella pneumophilla serogroup 1 infection. **Journal Clinical Pathology**, v.43, p.685-690, 1990.

BLOOD, D.C.; RADOSTITS, O.M. **Clínica Veterinária**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991, cap.21: Doenças causadas por vírus e clamídias-I: p.684-691.

BRENNER, J.; MEIRON, R.; AVRAHAM, R.; TRAININ, Z.; SAVIR, D. Prevalence of bovine leukemia virus (BLV) infectivity in some Israeli dairy herds. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, v.9, n.1, p.11-15, 1986.

BRENNER, J.; ROSENTHAL, I.; BERNSTEIN, S.; TRAININ, Z. The fat content of milk from dairy cattle infected with bovine leukosis virus. **Veterinary Research Communications**, v.14, p.167-171, 1990.

BRUCK, C.; MATHOT, S.; PORTETELLE, D.; BERTE, C.; FRANSSSEN, J.D.; HERION, P.; BURNY, A. Monoclonal antibodies define eight independent antigenic regions on the bovine leukemia virus (BLV) envelope glycoprotein gp51. **Virology**, v.122, p.342-352, 1982a.

BRUCK, C.; PORTETELLE, D.; BURNY, A.; ZAVADA, J. Topographical analysis of monoclonal antibodies of BLV gp51 epitopes involved in viral functions. **Virology**, v.122, p.353-362, 1982b.

BRUNEL, E.M.; MENDONÇA, N.Y.B.; COLMAN, O.L.R.; BULMAN, G.M. Leukosis enzoótica bovina. Tasa de prevalência en la provincial de Formosa (República Argentina) mediante la prueba de imunodifusion en gel de agar com antígeno glicoprotéico. **Revista de Medicina Veterinária**, v.62, n.6, p.486-490, 1981.

BURNY, A.; BRUCK, C.; CLEUTER, Y.; COUEZ, D.; DESCHAMPS, J.; GREGOIRE, D.; GHYSDAEL, J.; KETTMANN, R.; MAMMERICKX, M.; MARBAIX, G. Bovine leukaemia virus and enzootic bovine leukosis. **Journal Veterinary Research**, v.5, p.133-144, 1985.

BURRIDGE, M.J.; PUHR, D.M.; HANNEMANN, J.M. Prevalence of bovine leukemia virus infection in Florida. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.179, n.7, p.704-707, 1981.

BURRIDGE M.J.; THURMOND M.C.; MILLER J.M.; SCHMERR M.J.; VAN DER MAATEN M.J. Fall in antibody titer to bovine leukemia virus in the periparturient period. **Canadian Journal Comparative Medicine**, v.46, p.270-271, 1982.

CAMARGOS, M.F.; MELO, C.B.; LEITE, R.C.; STANCEK, D.; LOBATO, Z.I.P.; ROCHA, M.A.; SOUZA, G.N.; REIS, J.K.P. Frequência de soropositividade para Leucose Enzoótica Bovina em rebanhos de Minas Gerais. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.5, p.20-26, 2002.

CARVALHO, L.; BENESI, F.J.; BIRGEL JUNIOR, E.H.; BIRGEL, E.H. Prevalência de anticorpos séricos de anti-vírus da Leucose dos bovinos em animais da raça Holandesa preto e branca e zebuínos da nelore, criados no Pólo Regional de Londrina, estado do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v.17, n.1, p.53-57, 1996.

CIANFRIGLIA, M.; NUTI, M.; TURCHI, V.; BARCA, S.; TOMBESI, M.; MORRONE, S.; CENCIARELLI, C.; NATALI, P.G. High frequency production of hybridomas secreting antibodies to cell antigens. **Hybridoma**, v.6, n.6, p.673-677, 1987.

CLARCK, M.R & MILSTEIN, C. Expression of spleen cell immunoglobulin phenotype in hybrids with myeloma cell lines. **Somatic Cell Genetic**, v.7, n.6, p.657-666, 1981.

COCKRELL, G.L.; REYES, R.A. Bovine Leukemia Virus-Associated Lymphoproliferative Disorders. In: SCHALM, O. W.; FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 5. ed. Lippincott: Williams & Williams, p.614-619, 2000.

COFFIN, M.J., HUGHES, H.S., VARMUS, E.H. **Retroviruses**. Cold spring Harbor. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1997

DA Y.; SHANKS R.D.; STEWART J.A.; LEWIN H.A. Milk and fat yields decline in bovine leukemia virus-infected Holstein cattle with persistent lymphocytosis. **Proceeding of the National Academic Sciences of the United State America**, v.90, p.6538-6541, 1993.

D'ANGELINO, J.L. **Leucose enzoótica dos bovinos, estudo retrospectivo da performance produtiva e reprodutiva de animais infectados e não infectados**. Tese (Livre Docência em Clínica Médica) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1991.

D'ANGELINO, J.L.; GARCIA, M.; BIRGEL, E.H. Epidemiological study of enzootic bovine leukosis in Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v.30, p.13-15, 1998.

DEL FAVA, C.; PITUCO, E. M. Infecção pelo vírus da Leucemia Bovina (BLV) no Brasil. **O Biológico**, v.65, n.1, p.3-10, 2004.

DIGIACOMO, R.F.; DARLINGTON, R.L.; EVERMANN, J.F. Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy calves by dehoming. **Canadian Journal Comparative Medicine**, v.49, p.340-342, 1985.

DIGIACOMO, R.F. The epidemiology and control of bovine leukemia virus infection. **Veterinary Medical**, n.3, p.248-257, 1992.

DIMMOCK, C.K.; CHUNG, Y.S.; MACKENZIE, A.R. Factors affecting the natural transmission of bovine leukaemia virus infection in Queensland dairy herds. **Australian Veterinary Journal**, v.68, n.7, p.230-233, 1991.

DINIZ, J.M.F.; BARONI, J.M.; FERNANDES, B.F.; MARTINS, D.M. Leucose bovina no estado do Paraná. **Revista do Setor de Ciências Agrárias**, v.2, p.33-38, 1980.

DIVERS, T.J.; CASEY, J.N.; FINLEY, M.; DELANEY, M. Sporadic multicentric lymphosarcoma in a three-year-old bull. **Journal veterinary diagnostic investigation**, v.7, p.164-146, 1995.

DITTRICH, T. R. C. Produção de reagentes para diagnóstico da infecção pelo vírus da leucose bovina. Curitiba:2004. **Tese (doutorado)**, Universidade Federal do Paraná.

DUCREAU, F.; ARRIETA, E.; JIMENEZ, C.; MORENO, E.; RODRIGUEZ, L. Estudina sobre leucosis viral bovina ert Ganado *Bos indicos* en Costa Rica. **Ciências Veterinárias**, v.9, n.2/3, p. 95-99, 1987.

EMANUELSON, U.; SCHERLING, K.; PETTERSSON, H. Relationships between herd bovine leukemia virus infection status and reproduction, disease incidence, and productivity in Swedish dairy herds. **Preventive Veterinary Medical**, v.12, p.121-131, 1992.

EVERMANN, J.F.; DIGIACOMO, R.F.; HOPKING, S.G. Bovine leukosis virus: understanding viral transmission and the methods of control. **Veterinary Medical**, v.18, n.10, p.1051-1058, 1987.

FELDMAN, W.H. Lymphosarcoma in the bovine abomasum. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.73, p.206-215, 1928

FENNER, J.F.; GIBBS, E.P.J.; MURPHY, F.A. **Veterinary Virology**. 2 ed. San Diego: Academic Press, 1993. p.561-595.

FERRER, J.F.; BALICA, V.; DIGLIO, C. Recent studies on the characterization of the bovine leukemia virus (BLV); development of new methods for the diagnosis of BLV infection. **Veterinary Microbiology**, v.1, n.2, p.159-184, 1976.

FERRER, J.F.; MARSHAK, R.R.; ABT, D.A.; KENYON, S.J. Relationship between lymphosarcoma and persistent lymphocytosis in cattle: A review **Journal American Veterinary Medical Association**, v.175, n.7, p.705-800, 1979.

FERRER, J.F. Bovine leukosis: Natural transmission and principles of control. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.175, n.12, p.128-136, 1979.

FERRER, J.F. Bovine lymphosarcoma. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, v.24, p.01-68, 1980.

FERRER, J.F.; PIPER, C.E. Role of colostrum and milk in the natural transmission of the Bovine Leukemia Virus. **Cancer Research**, v.41, p.4906-4909, 1981.

FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; OLIVEIRA, C.; KREUTZ, L.C. Anticorpos contra o vírus da leucose bovina (VLB) em soro de bovinos provenientes da República Oriental do Uruguai. **A Hora Veterinária**, v.12, n.68, p.5-8, 1992.

FLORENT, G. An ELISA for the diagnosis of bovine leukemia virus infection. **Veterinary Record**, v.123, p.570-571, 1988.

FRENCH, D.; FISCHBERG, E.; BUHL, S.; SHARIF, M.D. The production of more useful monoclonal antibodies. **Immunology Today**, v.7, p.344-346, 1986.

GARCIA, M. et al. Efeito da infecção pelo vírus da leucose na ocorrência de mastite em bovinos. **A Hora Veterinária**, n.88, p.41-44, 1995.

GILLET, N.; FLORINS, A.; BOXUS, M.; BURTEAU, C.; NIGRO, A.; VANDERMEERS, F.; BALON, H.; BOUZAR, A.B.; DEFOICHE, J.; BURNY, A.; REICHERT, M.; KETTMANN, R.; WILLEMS, L. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. **Retrovirology**, v.16, p. 4-18, 2007.

GRAVES, C.; FERRER J.F. In vitro transmission and propagation of the bovine leukaemia virus in monolayer cell cultures. **Cancer Research**, v.36, p. 4152-4159, 1976.

GODING, J.M. Antibody production by hibridomas (review article). **Journal. Immunological Methods**, v.39, p.258-308, 1980

GONZÁLEZ, E.T.; OLIVA, G.A.; VALERA, A.; BONZO, E.; LICURSI, M. LEUCOSIS enzoótica bovina: evaluación de técnicas de diagnóstico (IDGA, ELISA-I, WB, PCR) en bovinos inoculados experimentalmente. **Anal Vet.**, v.21, p.12-20, 2001.

HARLOW, E.D.; LANE, D. **Antibody a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

HARRIS, H.; WATKINS, J.F. Hybrid cells derived from mouse and man. Artificial heterokaryons of mammalian cells from different species. **Nature**, v.205, p.640-646, 1965

HOPKINS, S.J.; EVERMANN, J.F.; DIGIACOMO, R.F.; PARISH, S.M.; FERRER, J.F.; SMITH, S.; BANGERT, R.L. Experimental transmission of bovine leukosis virus by simulated rectal palpation. **Veterinary Record**, v.122, p.389-390, 1988.

HUBNER, S.O.; WEIBLEN, R.; MORAES, M.P.; SILVA, A.M.; CARDOSO, M.J.L.; PEREIRA, N.M.; ZANINI, M. Infecção intra-uterina pelo vírus da leucose bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.21, n.4, p. 8-11, 1997.

HURRELL, J.G.R. **Monoclonal hibridomas antibodies: techniques and applications**, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, p.726, 1988.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - **IBGE**, 2007. Disponível em:<<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias>> Acesso em: 12/10/ 2008.

ITOHARA, S.; OIKAWA, I.; TERUI, S.; MIZUNO, Y. Infectivities of bovine leukemia virus in peripheral blood lymphocytes from naturally infected cattle and their relation to persistent lymphocytosis and antibody titers. **Japanese Journal Veterinary Science**, v.47, p.807-810, 1985.

JACOBS, R.M.; POLLARI, F.L.; MCNAB, B. A serological survey of bovine syncytial virus in Ontario: association with bovine leukemia and immunodeficiency-like viruses, production records, and management practices. **Canadian Journal Veterinary Research**, v.59, p.271-278, 1995.

JACOBS, R. M.; SONG,Z.; POON, H.; HEENEY, J.L.; TAYLOR, J.A. Proviral detection and serology in bovine leukemia virus-exposed normal cattle and cattle with lymphoma. **Canadian Journal Veterinary Research**, v.56, p.339-348, 1992.

JACOBSEN, K.L. Transmission of bovine leukemia virus: Prevalence of antibodies in precolostral calves. **Preventive Veterinary Medicine**, n.1, p.265-272, 1983.

JOHNSON, R.; GIBSON, C.D.; KANEENE, J.B. Bovine Leukemia virus: a herd-based control strategy. **Preventive Veterinary Medicine**, v.3, p.339-349, 1985.

JOHNSON, R.; KANEENE, J.B. Bovine leukemia virus. Part I. Descriptive epidemiology, clinical manifestations, and diagnostic tests. **Compendium Food Animal**, v.13, n. 2, p.315-324, 1991.

JOHNSON, R.; KANEENE, J. B. Bovine Leukemia Virus and Enzootic Bovine Leukosis. **Veterinary Bulletin**, v. 62, n. 4, p. 287-311, 1992.

JONES, T.C. **Patologia veterinária**. 6 ed. São Paulo: Manole, 2000. p.1415.

KANTEK, C. E.; KRUGER, E.R.; WELTE, V.R. Prevalência do Vírus da Leucose Enzoótica Bovina no Rebanho do Estado do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.2, n.3, p. 125-129,1983.

KEARNEY, J.F.; RADBRUCH, A.; LIESEGANG, B.; RAJEWSKY, K. A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreted hybrid cell lines. **Journal Immunological Methods**, v.123, p.1548-1550, 1979.

KETTMANN, R.; BURNY, A.; CALLEBAUT, I. Bovine leukemia virus. In: Levy, R. J. A., ed. **The Retroviridae**, p. 39–81, 1994.

KLINTEVALL, K. Bovine Leukemia Virus: Course of infection and means of detection. **Dissertation**. Departament of Veterinary Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences and The National Veterinary Institute. Department of Virology, Uppsala, Sweden, 1995.

KNAPEN, K.; KERKHOF, P.; MAMMERICKX, M. Eradication de la leucose bovine enzootique en Belgique: bilan du dépistage de masse réalisé sur l'ensemble du cheptel national en 1989, 1990 et 1991. *Ann. Medical Veterinary*, v.137, p.197-201, 1993.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, v.256, n. 5517, p.495-497, 1975.

KÖHLER, G. The techniques of hibridoma production. **Immunological Methods**, v.2, p.285- 298, 1981.

KÖHLER, G. Derivation and diversification of Monoclonal Antibodies. **Nobelprize, Nobel Literature, Physiology or Medicine**, 8 December, 1984.

KUBY, J.; CAMERON, J.; TODD, C.; MITCHELL, J. **Imunologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: livraria e editora Revinter Ltda, 2002.

LAMBERT, N.; MERTEN, O.W. Effect of serum-free and serum-containing medium on cellular levels of ER-based proteins in various mouse hybridoma cell lines. **Biotechnological Bioengienier**, v. 54, p. 165–180, 1997.

LANE, R.D; Crissman, R. S; Lachman, M.F. Comparison of polyethylene glycols as fusogens for producing lymphocyte-myeloma hybrids. **Journal Immunological Methods**, v.72, n.1, p.71-76, 1984.

LANE, R.D; Crissman, R.S; Ginn, S. High efficiency fusion procedure for producing monoclonal antibodies against weak immunogens. **Methods in enzymology**, v.121, p.183-192, 1986.

LASSAUZET, M.L.G.; THURMOND, M.C.; JOHNSON, W.O. Factors associated with in utero or periparturient transmission of bovine leukemia virus in calves on a California dairy. **Canadian Journal Veterinary Research**, v.55, p. 264-268, 1991.

LLAMES, L.; GOYACHE, J.; DOMÉNECH, A.; AVILA, A.; SUAREZ, G.; GOMEZ-LUCIA, G. Production and characterization of monoclonal antibodies against bovine leukaemia virus using various crude antigen preparations: a comparative study. **Journal Veterinary Medicine**, v.47, p.387–397, 2000.

LEITE, R.C.; LOBATO, Z.I.P.; CAMARGOS, M.F. Leucose Enzoótica Bovina. **Revista Conselho Federal Medicina Veterinária**, Brasília, n.31, p.20-28, 2004.

LOSINGER, W.C. Evaluating the uncertainty in estimates of the economic impacts of Bovine-Leukosis virus in U.S. dairy cows. **Agricultural Economics**, v.35, p.363-372, 2006.

LUCAS, M.H.; ROBERTS, D.A.; WIBBERLEY, G. Ear tattooing as a method of spread of bovine leukosis virus infection. **Brazilian Journal Veterinary**, v. 141, n.11, p.647-649, 1985.

MACHADO , C.P.A.; PEREIRA, W.A.; BIRGEL, E.H.; SOUZA,K.W. Prevalência da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos em rebanhos leiteiros criados no Estado do Amazonas. *Acta Amazonica*, v.33, n.1,p.111-125, 2003.

MANET, G.; GUILBERT, X.; ROUX, A.; VUILLAUME, A.; PARODI, A.L. Natural mode of horizontal transmission of bovine leukemia virus (BLV): the potential role of tabanids (*Tabanus* spp.) **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.22, p.255, 1989.

MAMMERICKX, M.; CORMANN, A.; BURNY, A.; DEKEGEL, D.; PORTETELLE, D. Eradication of enzootic bovine leucosis based on the detection of the disease by the gp- 51 immunodiffusion test. **Annalis de Recherches Veterinaires**, v.9, n.4, p.885-894, 1978.

MAMMERICKX M.; PORTETELLE D.; BURNY A.; LENNEN J. Detection by immunodiffusion and radio-immunoassay of antibodies to bovine leukemia virus antigen in sera of experimentally infected sheep and cattle. **Zentralbl. Veterinärmed**, v.27, p.291-297, 1980.

MAMOUN, R.Z.; MORISSON, M.; REBEYROTTE, N.; BUSETTA, B; COUEZ, D.; KETTMANN R.; HOSPITAL, M.; GUILLEMAIN B. Sequence variability of bovine leukemia virus *env* gene and its relevance to the structure and antigenicity of the glycoproteins. **Journal Virology**, v. 64 , p.4180–4188, 1990.

MARIN, C.; LOPEZ, N. M.; ALVAREZ, L.; LOZANO, O.; ESPANA, W.; CASTANOS, H.; LEON, A. Epidemiology of bovine leukemia in Venezuela. **Annales de Recherches Veterinaires**, v.9, n 4, p.743-746, 1978.

MARTINS, C. **Diagnóstico de situação educativo epidemiológico da leucose em fêmeas acima de 2 anos na espécie bovina**. Florianópolis: CIDASC, p.28, 1996.

MATOS, P.F.; BIRGEL, J.E.D.; BIRGEL, E.H. Leucose enzoótica dos bovinos: prevalência de anticorpos séricos em bovinos criados na Bahia e comparação entre resultados do teste de Elisa e da imunodifusão em gel de ágar. **Brazilian Journal of Veterinary Research the Animal Science**, v.42, p.171-180, 2005.

MCDONALD, R.; FERRER, J. F. Detection, quantitation and characterization of the major internal virion of the bovine leukemia virus by raio immunoassay. **Journal of the National Cancer Institute**, v.57, n. 4, p.875-882, 1976.

MERKT, H.; GIUDICE, J.C.O.; MÜLLER, J.A. Leucose Bovina: concepção moderna e primeira verificação da doença no Rio grande do Sul. **Revista de Escola de Agronomia e Veterinária do Rio Grande do Sul**, v.2, p.7-19, 1959.

MERZA, M.; SUNDQUIST, B.; SOBER, J.; MOREIN, B. Immunoaffinity purification of two major proteins of bovine leukemia virus (gp51 and p24) and their use for discrimination between vaccinated and infected animals. **Journal Virological Methods**, v.33, p.345-353, 1991.

MILLER, J.M.; OLSON, C. Precipitating antibody to an internal antigen of the C-type virus associated with bovine lymphosarcoma. **Journal of National Cancer Institute**, v.49, p.1459-1462, 1972.

MILLER, J.M.; VAN DER MATTEN, M.J. Sorologic detection of Bovine Leukemia Virus infection. **Veterinary Microbiology**, v.31, p.47-55, 1976.

MILLER, J.M.; VAN DER MAATEN. M.J. Infectivity tests of secretions and excretions from cattle infected with bovine leukemia virus. **Journal of National Cancer Institute**, v.62, p.425-428, 1979.

MILSTEIN, C. From the structure of antibodies to the diversification of the immune response. **Nobelprize, Nobel Literature, Physiology or Medicine**, 8 December, 1984.

MODENA, C.M.; ABREU, V.L.V.; SILVA, J.A.; MOREIRA, E.C.; AZEVEDO, N.A.; REHFELD, O.A.M. Ocorrência de infecção pelo Vírus da Leucose Enzoótica Bovina em animais importados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.35, n.4, p.565-573, 1983.

MOLNÁR, L.; MOLNÁR, E.; SANTOS, A. M.; CORÕA, A. C.; TÚRY, E. Leucose em bovinos jovens; dados epidemiológicos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.20, n.3, 1998.

MOFFAT, F.L JR.; PINSKY, C.M.; HAMMERSHAIMB, L.; PETRELLI, N.J.; PATT, Y.Z.; WHALEY, F.S.; GOLDENBERG, D.M. Clinical utility of external immunoscintigraphy with the IMMU-4 technetium -99m Fab' antibody fragment in patients undergoing surgery for carcinoma of the colon and rectum: results of a pivotal, phase III trial. **Journal Clinical Oncology**., v.14, p.2295-2305, 1996

MORAES, M.P.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F.; OLIVEIRA, J.C.D.; REBELATTO, M.C.; ZANINI, M.; RABUSKE, M.; HÜBER, S.O.; PEREIRA, N.M. Levantamento sorológico da infecção pelo vírus da Leucose Bovina nos rebanhos do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.26, n.2, p.257-262, 1996.

MULLER, F.; WITTMANN, W. **Evaluationsforschung. Aufgaben, Probleme und Anwendungen. Heidelberg**: Springer, 1990.

MURPHY, F.A.; GIBBS, E.P.J.; HORZINECK, M.C.; STUDDERT, M.J. **Veterinary Virology**, California: Academic Press, 3 ed., 1999, p.4495.

MUSSGAY, M.; KAADEN, O.R. Progress in studies on the etiology and serologic diagnosis of enzootic bovine leukosis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.79, p.43-72, 1978.

NATIONAL ANIMAL HEALTH MONITORING SURVEILLANCE (NAHMS). **Bovine Leukosis Virus (BLV) in U.S. Beef Cattle, 1997**. Disponível em: <<http://nahms.aphis.usda.gov/>>. Acesso 03/02/2009.

NELSON, P.N.; REYNOLDS, G.M.; WALDRON, E.E. Monoclonal Antibodies, **Journal Clinical Pathological**, v.53, p.111-117, 2000.

NOWINSKI, R.C.; TAM, M.R.; GOLDSTEIN, L.C. Monoclonal Antibodies for Diagnosis of Infectious Diseases in Humans. **Science**, v.219(4585), p 637-44, 1983.

NUOTIO, L.; RUSANEN, H.; SIHVONEN, L.; NEUVONEN, E. Eradication of enzootic bovine leukosis from Finland. *Prev. Vet. Med.* v.59, p.43-49, 2003.

OHSIMA K.; OKADA, K.; NUMAKUNAI, S. Pathological studies on juvenile bovine leucosis. **Japanese veterinary science**, v.42, p.659-671, 1980.

OIE. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals mammals, birds, bees**. 5 ed. Paris: OIE 2004. Cap. 2,3,4. Enzootic Bovine Leukosis.

OIE. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. **International Animal Health Code**.

Paris: OIE, 2001a. Disponível em: <<http://www.oie.int/Norms/MCode/htm>>. Acesso em: 06/02/ 2009.

OLIVER, E.O. Sporadic bovine leukosis with ataxia and tibiotarsal joint swelling: A case report. **Canadian veterinary journal**, v.35, p.777–779, 1994.

ONUMA, M.; OLSON, C.; BAUMGARTENER, L.E. An ether-sensitive antigen associated with bovine leukemia virus infection. **Journal of the National Cancer Institute**, v.55, p.1155-1158, 1975.

OTT, S. L.; JOHNSON, R.; WELLS, S. L. Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms. **Preventive Veterinary Medicine**, v.61, p.249-262, 2003.

PELZER, K.D.; SPRECHER, D.J. Controlling BLV infection on dairy operations. **Veterinary Medicine**, v.88, p.275-281, 1993.

PELZER, K. D. Economics of bovine leukemia virus infection. **Veterinary Clinics of North American Animal Food Practice**, v.13, p.129- 141, 1997.

PERINO, L.J.; WRIGHT, R.E.; HOPPE, K.L.; FULTON, R.W. Bovine leukosis virus transmission with mouthparts from *Tabanus abactor* after interrupted feeding. **American Journal Veterinary Research**, v.51, p.1167- 1169, 1990.

POLETO, R.; KREUTZ, L.C.; GONZALES, J.C.; BARCELLOS, L.J.G. Prevalência de tuberculose, brucelose e infecções víricas em bovinos leiteiros do município de Passo Fundo, RS. **Ciência Rural**, v.34, n.2, p.595-598, 2004.

PONTECORVO, G. Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethylene glycol treatment. **Somatic Cell Genetic**, v.1, n.10, p.397-400, 1975.

PORTETELLE, D.; BRUCK, C.; MAMMERICKX, M.; BURNY, A. Use of monoclonal antibody in an ELISA test for the detection of antibodies to bovine leukemia virus. **Journal Virological Methods**, v.6, p.19-28, 1983.

POTTER, M. Immunoglobulin-producing tumors and myeloma proteins of mice. **Physiology Review**, v.52, n.3, p.631-719, 1972.

PRAVTCHEVA, D.D.; RUDDLE, F.H. X chromosome-induced reversion of chromosome segregation in mouse/Chinese hamster somatic cell hybrids. Cellular recognition of native and foreign X chromosomes. **Experimental Cell Research**, v.146, n.2, p.401-416, 1983.

RABBANI, H.; BROWN, W. R.; BUTLER, J. E.; HAMMARSTRÖM, L. Polymorphism of the IGHG3 gene in cattle. **Immunogenetics**, v.46, p.326-331, 1997.

RADOSTITS O.M.; GAY C.C.; BLOOD D.C.; HINCHCLIFF, K.W. **Clínica Veterinária** - Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 9 ed., 2002, p.940-951.

RANGEL, N.M.; MACHADO, A.V. Contribuição à oncologia comparada em Minas Gerais. **Arquivos da Escola Superior de veterinária do Estado de Minas Gerais**, v.1, p.84-96, 1943.

REICHEL, M.P.; THAM, K.M.; BARNES, S. Evaluation of alternative methods for the detection of bovine leukaemia virus in cattle. **New Zeland Veterinary Journal**, v.46, p.140-146, 1998.

REINHARDT, G.; HOCHSTEIN-MINTZET, V.; RIEDEMANN, S.; LEAL, H.; NIEDDA, M. Estúdio sorológico de leucosis enzootica bovina enun predia de la provencia da Valdivia y su relation a parâmetros productivos y reproductivos. **Journal Veterinary Medicine**, v.35, p.178-185. 1988.

RIET-CORREA, F.; GARCIA, M. Tuberculose. In: Riet-Correa F. **Doenças de ruminantes e eqüinos**. São Paulo: Varela, 2 ed., 2001. v.1, p.351-362.

RHODES, J.K.; PELZER, K.D.; JOHNSON, Y.J.; RUSSEK-COHEN, E. Comparison of culling rates among dairy cows grouped on the basis of serologic status for bovine leukemia virus. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.223, p.229- 231, 2003.

ROMERO, C.H.; ROWE, C.A. Enzootic bovine leukosis in Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v.13, p.107-111, 1981.

ROMERO, C. H.; CRUZ, G. B.; ROWE, C. A. Transmission of bovine leukemia vírus in milk. **Tropical Animal Health and Production**, v.2, p.215-218, 1983.

SANTOS, J.L.; RIBEIRO, M.F.B.; FARIA, J.E.; SALCEDO, J.H.P. Epidemiologia da Leucose Enzoótica Bovina no estado de Minas Gerais .I- Prevalência na Zona da Mata. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.37, n.4, p.359-368, 1985.

SAMAGH, B.S.; KELLAR, J.A. Seroepidemiological survey of bovine leukaemia virus infection in Canadian cattle. **Current topics in veterinary medicine and animal science**, v.15, p.397-412, 1982.

SARGEANT, J. M.; KELTON, D. F.; MARTIN, S. W.; MANN, E. D. Associations between farm management practices, productivity, and bovine leukemia virus infection in Ontario dairy herds. **Preventive Veterinary Medecine**, v.31, p.211-221, 1997.

SASAKI, O.; TANAKA, M.; OKABE, T.; IMANISHI, J. Production of monoclonal antibody to bovine leukemia virus glycoprotein gp51 by in vitro immunization. **Microbiology and immunology**, v.34, n.4, p.401-405, 1990.

SCHMITT, J.J; Zimmermann, U; Neil, G.A. Efficient generation of stable antibody forming hybridoma cells by electrofusion. **Hybridoma**. v.8, n.1, p.107 -115, 1989.

SCHOTTLE, F.; SCHOTTLE, H. Über ätiologie und therapie der aleukämischen lymphadenose des rindes. **Berliner Munchener Tierarztliche Wochenschrife**, v. 50, p.497-517, 1934.

SEIKI, M.; EDDY, R.; SHOWS, T.B.; YOSHIDA, M. Nonspecific integration of the HTLV provirus genome into adult T-cell leukaemia cells. **Nature**, v.309, p.640-642, 1984.

SHETTIGARA, P.T.; SAMAGH, B.S.; LOBINOWICH, E.M. Eradication of bovine leukemia vírus infection in commercial dairy herds using the agar gel immunodiffusion test. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 50, p.221-226, 1996.

SHULMAN, M.; WILDE D.C.; KÖHLER, G. A better cell line for marking hibridomas secreting specific antibodies. **Nature**, v.276, p.269-270, 1978

SORENSEN, D.K. Bovine lymphotic leukemia. Epidemiologic estudies. **WHO** - Conference on Comparative Study Leukemias. Philadelphia, rep. 26, 1961.

SORENSEN, D. Clinical manifestations of Bovine Leukosis. In: **Bovine Leukosis Symposium**, Maryland, 1979. Procesings College Park Maryland, May 22 – 23,1979, p.5–15.

SPRECHER, D.J., PELZER, K.D., LESSARD, P. Possible effect of altered management practices on seroprevalence of bovine leukemia virus in heifers of a dairy herd with history of high prevalence of infection. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.199, n.5, p.584-588, 1991.

STAHL, C; STAEHELIN, T; MIGGIANO, V. Spleen cell analysis and optimal immunization for high-frequency production of specific hybridomas. **Methods in Enzymology**, v. 92, p.26-36, 1983.

STEINMAN, H.L.; ROSENBAUM, J.T.; SRIRAM, S.; McDEVITT, H.O. In vivo protective effets of antibodies to immune response gene products: prevention of experimental allergic ancephalitis. **Proceedings National Academy Sciences**, v.78, p.7111-7114, 1981.

STOBER, M. The clinical picture of the enzootic and sporadic forms of bovine leukosis. **Bovine Practioner**, v.16, p.119-129, 1981.

STOCK, N.D.; FERRER, J.F. Replicating C-type virus in phytohemagglutinin-treated buffy-coat cultures of bovine origin. **Journal National Cancer Institute**, v.48, p.985–996, 1972.

STRAUB, O.C. Enzootic Bovine Leukosis. In: Gibbs, E.P.J. (Ed). **Virus Diseaes of Food Animals**. V. II. London: Academic Press, 1981. Cap. 28, p. 683-718.

SUZUKI, T.; IKEDA, K. The mouse homolog of bovine leukemia virus receptor is closely related to the α subunit of the adapter-related protein complex AP-3, not associated with the cell surface. **Journal Virology**, v.72, p.593-599, 1998.

SYMONS, D.B.A.; CLARKSON, C. A.; BEALE, D. Structure of bovine immunoglobulin constant region heavy chain gamma 1 and gamma 2 genes. **Molecular Immunology**, v.26, n.9, p.841-850, 1989.

THOMPSON, K.G. **New Zealand Veterinary Journal**, v.33, p.188, 1993.

THURMOND, M.C.; CARTER, R.L.; PUHR, D.M. An epidemiological study of natural in utero infection with bovine leukemia virus. **Canadian Journal Comparative Medicine**, v.47, p. 316-319, 1983.

TIERSEUCHENBERICHT. **Amtliche Mitteilung des Bundesministers for Erchrung, Landwirtschaft und Fortsten**, 1983.

VANLEEUEWEN, J.A.; KEEFE, G.P.; TREMBLAY, R.; POWER, C.; WICHTEL, J.J. Seroprevalence, spatial distribution and productivity effects on infection with John's Disease and bovine leucosis in Maritime Canadian dairy cattle. In: **Proceedings of the international symposium on veterinary epidemiology and economics**, Breckenridge, CO, USA, 2000.

VAN DER MAATEN, M.J.; MILLER, J.M.; BOOTHE A.D. Replicating type-C virus particles in monolayer cell cultures of tissue from cattle with lymphosarcoma. **Journal National Cancer Institute**, v. 52, p.491, 1974.

VAN DER MAATEN, M.J.; MILLER, J.M. Replication of bovine leukemia virus in monolayer cell cultures, **Bibl. Haematology**, v.43, p.360-362, 1976.

VAN DER MAATEN. M.J.; MILLER J.M., SCHMERR, M.J.F. In utero transmission of bovine leukemia virus. **American Journal Veterinary Research**, v.42, n.42, n.6, p.1052-1054, 1981.

VAN DER MAATEN, M.J., MILLER, J.M., SCHMERR, M.J.F. Factor affecting the transmission of bovine leukemia virus from cows to their offspring In: **4th International Symposium On Bovine Leukosis: ECSC, EEC, EAEC**, Straub. O. C. (Ed.) Brussels-Luxembourg, p. 225-240, 1982.

VAN DER MAATEN, J.M.; MILLER J.M. Bovine Leukosis Virus. In: **Z. Dinter and B. Morein (Eds), Virus infections of ruminants**. Amsterdam, Elsevier Science Publishers B.V., 419-429, 1990.

WAGNER ,H.J.; BLANKENSTEIN, P.; BONDZIO, A.; EBNER, D.; RISSE, S. Increase of antigen production in BLV-infected cell-lines via additional expression of tax. **Journal Veterinary Medical**, v.42, p.543-550, 1995.

WALKER, P.J.; MOLLOY, B.; RODWELL, J. B. A protein immunoblot test for detection of bovine leukemia virus p24 antibody in cattle and experimentally infected sheep. **Journal Virology Methods**, v15, p.201–211, 1987.

WEISS, R. A. The discovery of endogenous retroviruses. *Retrovirology*, v.3, p.67, 2006

WESTERWOUTD, R.J. Improved fusion methods: IV. technical aspects. **Journal Immunological Methods**, v.77, p. 181-96, 1985.

WHO. Proposed rules for the designation of immunoglobulin of animal origin. **WHO Bulletin**, v.56, p.815-817, 1978.

WILESMITH, J.W.; STRAUB, O.C.; LORENZ, R.J. Some observations on the epidemiology of bovine leukosis virus infection in a large dairy herd. **Research in Veterinary Science**, v. 28, p. 10-16, 1980.

ANEXO

ANEXO 1 – Meio Base F-10 HAM – 199

Solução A

- 10,6 g Meio 199
- 1,3 g Bicarbonato de Sódio
- 1000 mL Água Purificada q.s.p.
- Corrigir o pH para 7.2 – 7.4

Solução B

- 9,8 g Meio F-10 HAM
- 1,3 g Bicarbonato de Sódio
- 1000 mL Água Purificada q.s.p.
- Corrigir o pH para 7.2 – 7.4

Preparo do meio:

Misturar a solução A e B e filtrar em membrana 0,22 µm e retirar uma alíquota para teste de esterilidade.

ANEXO 2 – Meio de Crescimento F-10 HAM – 199

- 5% - 10% SFB (Soro Fetal Bovino) q.s.p.
- 100 µL/mL Sulfato de Gentamicina 40 µg/mL
- 2,5 µg/mL Anfotericina B
- Meio Base F-10 HAM – 199

ANEXO 3 – Meio Base – RPMI 1640

- 16,4 g RPMI 1640
- 1,3 g Bicarbonato de Sódio
- 1000 mL Água Purificada q.s.p.
- Corrigir o pH para 7.2 – 7.4

Preparo do meio:

Filtrar em membrana 0,22 µm e retirar uma alíquota para teste de esterilidade.

ANEXO 4 – Meio Completo – RPMI 1640

- 20% SFB (Soro Fetal Bovino) q.s.p.
- 100 µL/mL Sulfato de Gentamicina 40 µg/mL
- 2,5 µg/mL Anfotericina B
- Meio Base – RPMI 1640 q.s.p.

ANEXO 5 – Meio 8-Azaguanina

Solução estoque 8-Azaguanina

- 10 mg 8-Azaguanina
- 10 mL Meio Base

Meio 8-Azaguanina

- 2 mg/100 mL 8-Azaguanina
- Meio Completo – RPMI 1640

ANEXO 6 – Meio HAT – Hipoxantina Aminopterina Timidina

Solução estoque HAT

- 6,8 mg HAT
- 10 mL Meio Base

Meio HAT

- 1,36 mg/100 mL HAT
- Meio Completo – RPMI 1640

ANEXO 7 – Meio HT – Hipoxantina Timidina

Solução estoque HT

- 6,8 mg HT
- 10 mL Meio Base

Meio HT

- 1,36 mg/100 mL HAT
- Meio Completo – RPMI 1640

ANEXO 8 – Solução para produção do antígeno

A) Solução PBS

Solução PBS 50x

- 6 g Fosfato de Sódio Dibásico
- 1 g Fosfato de Potássio Monobásico
- 1 g Cloreto de Potássio
- 100 mL Água Purificada

Solução PBS – N

- 20 mL Solução PBS 50x
- 8 g Cloreto de Sódio
- 1000 mL Água Purificada q.s.p.

B) Gradiente Sacarose 30%

- 120 g Sacarose
- 80 g Água Purificada

C) Tampão TEN

- 1,21 g TRIS
- 0,37 g EDTA
- 11,68 g NaCl
- 1000 mL de Água Purificada q.s.p.
- Corrigir o pH para 7,4

D) Tampão de Lise

- 1% SDS
- 1% Triton X-100
- 1% Ácido Deoxicólico
- 0,05M TRIS-HCl
- 0,15M NaCl
- Corrigir o pH para 7,2

ANEXO 9 – Gel de Ágar

Solução Tampão Imunodifusão

- 42,5 g Cloreto de Sódio
- 0,1 g Cloreto de Potássio
- 0,6 g Fosfato de Sódio (anidro)
- 0,1 g Fosfato de Potássio
- 0,186 g EDTA Dissódico
- 0,05 g Azida Sódica
- 500 mL Água Purificada q.s.p.
- Corrigir o pH para 7,3

Ágar

- 0,9 g Ágar Noble
- 100 mL de Tampão de imunodifusão

ANEXO 10 – Solução Sacarose 11,6%

- 11,6 g Sacarose
- 100 mL de Água Purificada q.s.p.

ANEXO 11 – Soluções Elisa

A) Tampão de Adsorção

- 1,59 g Carbonato de Sódio
- 2,93 g Bicarbonato de Sódio
- 1000 mL Água Purificada q.s.p.

B) Solução Lavagem

- 1,5 mL Tween 20
- 1000 mL Tampão TRIS q.s.p.

C) Tampão TRIS

- 8,7 g Cloreto de Sódio
- 0,372 g EDTA
- 6,05 g TRIS
- 1000 mL Água Purificada q.s.p.
- Corrigir o pH para 7,4 com HCl 50%

D) Tampão Bloqueio e Diluição de Amostra

- 30 g BSA Fração V
- 1,5 mL Tween 20
- 1,0 g Azida Sódica
- 1000 mL Tampão TRIS q.s.p.

E) Tampão de Diluição de Conjugado

- 30 g BSA Fração V
- 1,5 mL Tween 20
- 100 mL Soro de Cavalo
- 1000 mL Tampão TRIS q.s.p.

F) Substrato**Solução Tampão Citrato**

- 5,11 g Ácido Cítrico
- 9,15 g Fosfato de Sódio Monobásico
- 1000 mL Água Purificada
- Corrigir o pH para 4,0

Solução Reveladora Cromógeno-Substrato (OPD)

- 400 mg OPD
- 1000 mL Tampão Citrato q.s.p.

Solução Reveladora

- 32 µL Peróxido de Hidrogênio 30 Vol.
- 100 mL Solução Reveladora Cromógeno-Substrato (OPD)

ANEXO 12 – Soluções e Gel para Eletroforese**A) Tampão Corrida****Tampão de Corrida 10x Concentrado**

- 30,3 g TRIS
- 144 g Glicina
- 0,5 g SDS
- 1000 mL Água Purificada q.s.p.
- Corrigir o pH para 8,6

Tampão Corrida

- 100 mL Tampão Corrida 10x
- 900 mL Água Purificada

B) Gel Acrilamida – Separação 12,5%

Solução Acrilamida:Bis 30:0,8 (%)

- 90 g Acrilamida
- 2,4 g Bis-Acrilamida
- 300 mL Água Purificada q.s.p

Gel Acrilamida – Separação 12,5%

- 7 mL de Água Purificada
- 6,25 mL Bis-Acrilamida
- 2,18 mL 3M TRIS-HCl (pH 8,8)
- 156 µL SDS 10%
- 38,1 µL APS 20%
- 7,8 µL TEMED

C) Gel Acrilamida – Empilhamento 5%

- 2,85 mL de Água Purificada
- 625 µL Bis-Acrilamida
- 250 µL 1M TRIS-HCl (pH 6,8)
- 37,5 µL SDS 10%
- 13,75 µL APS 20%
- 1,9 µL TEMED

D) Tampão Amostra

- 0,45 g TRIS
- 0,5 g SDS
- 2,0 mL glicerol
- 0,1 mL EDTA 0,1 M
- 0,2 mg azul de bromofenol
- 20 mL Água Purificada q.s.p.
- 240 µL 2-mercaptoetanol (no momento do uso)

E) Solução Coomassie Azul Brilhante

- 0,25 g Coomassie Brilhante R250

- 50 mL Metanol
- Ácido Acético

ANEXO 13 – Soluções *Western Blotting* e Isotipagem

A) Tampão transferencia *Western Blotting*

- 3,0 g TRIS 25 mM
- 14,4 g Glicina 192 mM
- 1,0 g SDS 0,1%
- 1000 mL Água Purificada q.s.p.
- Corrigir o pH para 8,4

B) Para WB e isotipagem, Solução Bloqueio e diluição da amostra, igual ELISA

C) Para WB e isotipagem, Solução Lavagem, igual ELISA

D) Substrato *Western Blotting*

- 30 mg 4-cloro 1-naftol
- 29 µL Peróxido de Hidrogênio
- 10,7 mL metanol
- 7,14 mL PBS (10X concentrado)
- 57 mL Água Purificada

C) Substrato isotipagem, igual ELISA